

Caco-2 細胞 sheet における Poly-L-arginine の水溶性  
高分子薬物の透過促進機構に関する研究

八巻 努

## 目次

緒言	・・・	1
第1編 水溶性高分子薬物の <i>in vivo</i> ラット腸管からの吸収及び <i>in vitro</i> Caco-2 細胞 sheet を介した透過に対する PLA の効果		
第1章 種々腸管部位からの FD-4 の吸収に対する PLA の促進効果		
第1節 小緒言	・・・	6
第2節 実験方法		
1-2-1 試薬	・・・	8
1-2-2 動物実験	・・・	8
1-2-3 静脈内投与	・・・	8
1-2-4 <i>In situ</i> closed loop 実験	・・・	9
1-2-5 血漿採取法	・・・	9
1-2-6 血漿中 FD-4 濃度測定	・・・	9
1-2-7 動態学的解析	・・・	10
1-2-8 Immunoblot analysis	・・・	10
1-2-9 統計解析	・・・	12
第3節 結果		
1-3-1 腸管各部位における FD-4 の吸収に対する PLA の効果	・・・	13
1-3-2 腸管各部位における PLA の吸収促進効果に対するタンパク質分解酵素阻害剤の影響	・・・	16
1-3-3 腸管各部位における occludin の発現量	・・・	19
第4節 小括	・・・	20
第2章 Caco-2 細胞 sheet における経上皮電気抵抗、FD-4 透過性、TJ 関連タンパク質の局在性及び発現量に対する PLA の影響		
第1節 小緒言	・・・	22
第2節 実験方法		
2-2-1 試薬及び抗体	・・・	23

2-2-2	細胞培養	・・・	23
2-2-3	経上皮電気抵抗 (TEER) の測定	・・・	24
2-2-4	FD-4 透過実験	・・・	25
2-2-5	FD-4 透過経路の観察	・・・	26
2-2-6	MTT assay	・・・	26
2-2-7	Immunofluorescence microscopy	・・・	26
2-2-8	Immunoblot analysis	・・・	27
2-2-9	統計解析	・・・	27
第3節 結果			
2-3-1	Caco-2 細胞 sheet における TEER 及び FD-4 透過性に対する PLA の影響	・・・	29
2-3-2	Caco-2 細胞 sheet における TJ 関連タンパク質の 局在性に対する PLA の濃度による影響	・・・	32
2-3-3	Caco-2 細胞 sheet における AJ 関連タンパク質の 局在性に対する PLA の影響	・・・	35
2-3-4	Caco-2 細胞 sheet における TJ 関連タンパク質の 発現量に対する PLA の影響	・・・	36
2-3-5	PLA による透過促進効果の可逆性の検討	・・・	37
第4節 小括			・・・ 40

## 第2編 PLA による TJ 関連タンパク質の細胞間隙部位からの消失機構

第1節 小緒言			・・・ 42
第2節 実験方法			
3-2-1	試薬及び抗体	・・・	45
3-2-2	細胞培養	・・・	45
3-2-3	エンドサイトーシス阻害剤含有溶液の 調製並びに適用	・・・	45
3-2-4	TEER 測定並びに FD-4 透過実験	・・・	46
3-2-5	Erythritol 透過実験	・・・	47
3-2-6	Immunofluorescence microscopy	・・・	48
3-2-7	統計解析	・・・	48

### 第3節 結果

- 3-3-1 エンドサイトーシス阻害剤存在下での Caco-2 細胞 sheet における TEER 及び FD-4 透過性に対する PLA の影響 . . . 49
- 3-3-2 エンドサイトーシス阻害剤存在下での Caco-2 細胞 sheet における TJ 関連タンパク質の局在性に対する PLA の影響 . . . 51
- 3-3-3 クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤存在下での Caco-2 細胞 sheet における erythritol 透過性に対する PLA の影響 . . . 55
- 3-3-4 PLA 適用後における occludin の細胞内局在部位の同定 . . . 56

### 第4節 小括 . . . 58

## 第3編 PLAにより引き起こされる Caco-2 細胞内のリン酸化タンパク質の同定並びに機能解析

### 第1節 小緒言 . . . 60

### 第2節 実験方法

- 4-2-1 試薬及び抗体 . . . 62
- 4-2-2 細胞培養 . . . 62
- 4-2-3 抗体アレイ法 . . . 62
- 4-2-4 MAPK 阻害剤の調製 . . . 63
- 4-2-5 TEER 測定並びに FD-4 透過実験 . . . 63
- 4-2-6 Recovery 試験 . . . 64
- 4-2-7 Immunoblot analysis . . . 64
- 4-2-8 統計解析 . . . 65

### 第3節 結果

- 4-3-1 PLA 適用による各種タンパク質のリン酸化レベルの解析 . . . 66
- 4-3-2 PLA による水溶性高分子薬物の透過促進効果に対する MAPK 阻害剤の影響 . . . 69
- 4-3-3 TJ の再形成と MAPK の関連性 . . . 70

第4節 小括	．．． 73
結論	．．． 75
謝辭	．．． 80
引用文献	．．． 81

## 緒言

一般に薬物の脂溶性度の低下や分子量の増加に伴い、上皮粘膜からの薬物の吸収性は低下する。特に生理活性ペプチドやタンパク質性医薬品のような水溶性高分子薬物は、上皮粘膜からほとんど吸収されず、生物学的利用率は極めて低い。従って、このような薬物の投与には注射といった侵襲的な方法しかなく、利便性が低い上に患者への負担が大きいと考えられる。そのため、水溶性高分子薬物を上皮粘膜から効率的に吸収させるドラッグデリバリーシステムは、注射による投与法の代替システムとして注目されている。上皮粘膜からの水溶性高分子薬物の吸収を高める方策の 1 つに吸収促進剤の利用が挙げられる。これまでに界面活性剤や胆汁酸、脂肪酸などの様々な物質が吸収促進剤の候補として検討されてきた<sup>1-5)</sup>。しかし、それらのほとんどは薬物の吸収は大きく改善するものの、膜タンパク質の漏出や細胞の脱落等の傷害性が認められ、それらの吸収促進剤候補物質による薬物吸収の増大と粘膜に対する傷害性の間にはパラレルな関係があると報告されている<sup>3,6)</sup>。

近年、新たな吸収促進剤の候補物質として、chitosan やその誘導体、dendrimer のようなポリカチオン性物質や NO 供与体、claudin modulator が見出され、これらは上皮粘膜にほとんど傷害を与えることなく、水溶性高分子薬物の吸収を改善することが報告されている<sup>7-11)</sup>。

このような背景の中、Natsume らは水溶性高分子薬物の吸収を改善させる吸収促進剤の候補物質として poly-L-arginine (PLA) を見出し<sup>12)</sup>、検討を行ってきた。これまでの研究で、PLA はラット鼻粘膜において、モデル水溶性高分子薬物である fluorescence isothiocyanate dextrans (FD-4, 10, 40, 70, 150, MW 4,400-16,7000)

及び recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) の吸収性を改善することが報告されている<sup>13,14)</sup>。また、家兎摘出鼻粘膜を用いた研究では、FD-4 の吸収性の改善が主に細胞間隙経路を介したものであることが明らかとなっている<sup>15)</sup>。これは、PLA が細胞間隙部位に存在する tight junction (TJ) 関連タンパク質の occludin 及び ZO-1、adherence junction (AJ) 関連タンパク質の E-cadherin を細胞間隙部位から消失させ、細胞間隙経路が開口することにより、FD-4 の吸収を増加させる<sup>15)</sup>。この開口メカニズムのさらなる検討の結果、TJ 関連タンパク質の occludin の脱リン酸化と ZO-1 のリン酸化が関係しており<sup>16)</sup>、PLA の吸収促進メカニズムには kinase や phosphatase のようなリン酸化・脱リン酸化反応に深く関わる酵素が関与することが予想された。しかし、家兎摘出鼻粘膜を用いた研究では、動物間での抗体の交差性、タンパク質量の不足により、さらなる詳細な解析が困難であった。そのために、PLA による細胞間隙経路の開口メカニズムに関しては未だに不明な点が多い。

TJ は上皮細胞や内皮細胞シートにおいて、アピカル側に認められ、隣接する細胞同士を接着している。TJ の形成は Furuse らにより同定されたタンパク質群である TJ 関連タンパク質が重要な役割を果たしており、TJ 関連タンパク質として、四回膜貫通タンパク質である claudins が TJ の構築に重要な要素の一つであることが示されている<sup>17,18)</sup>。Claudins は 27 のファミリーから成り、claudins の発現により細胞間隙の物質の透過が制御されていることが示されている<sup>19,20)</sup>。また、tight junction associated MARVEL proteins (TAMPs) と呼ばれるファミリーも存在する。これも claudins と同様に四回膜貫通タンパク質であり、occludin や tricellulin、MARVEL D3 が知られている<sup>21-23)</sup>。Occludin は TJ 関連の膜貫通タンパク質として、最初に発見されたタンパク質であり、多くの研究が行われてきた<sup>24-26)</sup>。興味深いことに、embryonic stem cells 及びマウスを用いた occludin ノック

クアウトモデルにおいて、occludin が TJ の形成や維持において必須のタンパク質ではないことが明らかとなった<sup>27,28)</sup>。その一方で、水溶性高分子薬物の透過の制御において、occludin は重要な役割を果たしていることが明らかとなっている<sup>29,30)</sup>。加えて、細胞シート上には 3 つの細胞が交わる点にも TJ が存在する。このような部位には claudins や occludin ではなく、tricellulin と呼ばれる四回膜貫通タンパク質が発現しており、三細胞間における物質の透過を制御している。マウス乳腺上皮細胞株の Eph4 を用いた RNA 干渉による tricellulin のノックダウン研究では、三細胞間のみならず、細胞間の TJ の構造も破綻することから、TJ の形成においても重要な役割を持つことが予想されている<sup>22)</sup>。また、上記に示した TJ 関連の膜貫通タンパク質は、細胞質において、ZO-1 や multiple PDZ domain protein (MUPP1) のような scaffold タンパク質と結合し、アクチン骨格に繋ぎ止められている<sup>31-33)</sup>。

これまでに、カプリン酸ナトリウムが PLC 依存的な IP<sub>3</sub>/DAG 経路及び MLCK を介して細胞間隙経路を開口させることが報告されている<sup>34)</sup>。Claudin modulator は直接的に TJ 関連タンパク質である claudin-4 と結合することで、claudin-4 を TJ から選択的かつ可逆的に消失させる<sup>35)</sup>。ポリカチオン系の吸収促進剤である chitosan では、インテグリン受容体を介した Src 及び Focal adhesion kinase (FAK) の活性化により、細胞間隙経路の開口が誘導されることが報告されている<sup>36)</sup>。一方、PLA による細胞間隙経路の開口に関わる詳細なメカニズムは不明であるが、細胞間隙経路の開口は、TJ 関連タンパク質のリン酸化及び脱リン酸化により引き起こされ、それらタンパク質が細胞内へ移動して TJ 部から消失することが予想される。従って、TJ 関連タンパク質の局在性や発現量の変化、細胞内で変化が認められるタンパク質のリン酸化レベルの変化と細胞間隙透過性との関連性を検討することは、PLA の吸収促進メカニズムの解析を行う上で極めて重



要である。

本研究の目的は、これまでに明らかにされていない PLA による水溶性高分子薬物の吸収促進メカニズムを明らかにすることである。そのため、TJ のメカニズム解析に汎用されている系の 1 つである Caco-2 細胞を中心に検討を行うことにした。Caco-2 細胞はヒト結腸癌由来の細胞株であり、薬物の透過並びに TJ の機能を評価する研究に数多く使用されているため、情報も豊富である。すなわち、Caco-2 細胞は PLA の細胞間隙開口メカニズムを評価する上で非常に有用な材料であると考えられる。しかし、PLA がラット鼻粘膜や家兎摘出鼻粘膜と同様に腸管上皮においても吸収促進効果を示すかどうかはほとんど明らかとなっていない。そこで、第 1 編では *in vivo* ラット腸管及び *in vitro* 培養細胞評価系を用いて PLA による水溶性高分子薬物の吸収促進効果を評価することを目的として、第 1 編第 1 章では、ラット腸管各部位に対する PLA の吸収促進効果を、*in situ* closed loop 法にて検討した。また、第 1 編第 2 章では *in vitro* での評価系として Caco-2 細胞 sheet を用いて、水溶性高分子薬物の透過性、細胞傷害性及び TJ 関連タンパク質の局在性並びに発現量に対する PLA の影響を検討した。これらの検討により、PLA がラット鼻粘膜や家兎摘出鼻粘膜と同様に水溶性高分子薬物の吸収促進効果を示すかどうかを明らかにした。第 2 編では、PLA により引き起こされる TJ 関連タンパク質の消失機構に関して検討した。一般的に TJ 関連タンパク質の細胞間隙部からの消失には、TJ 関連タンパク質の分解やエンドサイトーシスによる細胞内への内在化が知られている。そこで、PLA による水溶性高分子薬物の FD-4 の透過促進効果及び TJ 関連タンパク質の局在性の変化に対するエンドサイトーシス阻害剤の影響を評価し、どのようなメカニズムで TJ 関連タンパク質が消失するかを明らかにした。第 3 編では、PLA により引き起こされる細胞間隙経路の開口及びその後の TJ の再形成には細胞内でのタンパク

質のリン酸化及び脱リン酸化が深く関与していることが予想されたため、PLAの適用によりリン酸化レベルの変化が認められるタンパク質を抗体アレイ法を用いて評価した。さらに、抗体アレイ法で同定されたリン酸化タンパク質に対する特異的な阻害剤を用いて、PLAによる細胞間隙経路の開口との関連性、並びに TJ の再形成との関連性を調査した。

## 第 1 編 水溶性高分子薬物の *in vivo* ラット腸管からの吸収及び

### *in vitro* Caco-2 細胞 sheet を介した透過に対する PLA の効果

## 第 1 章 種々腸管部位からの FD-4 の吸収に対する PLA の促進効果

### 第 1 節 小緒言

Ohtake ら及び Natsume らは、既に *in vitro* 家兔摘出鼻粘膜並びに *in vivo* ラット鼻粘膜において、PLA がモデル水溶性高分子薬物である FD-4 の吸収を改善することを報告している<sup>14,15)</sup>。しかし、PLA の吸収促進効果は鼻粘膜上皮細胞及び眼組織<sup>37)</sup>において研究されているが、消化管各部位において、PLA が水溶性高分子薬物の吸収を促進するかどうかはほとんど検討されていない。さらに、腸管粘膜は鼻粘膜上皮とは異なり、食物由来の様々な物質を効率的に取り込むことに適した構造、機能を有している。主に水分を吸収するために微絨毛が発達していない結腸に対し、主な薬物吸収部位である小腸前半部分の十二指腸や空腸は微絨毛構造が発達しており、表面積が著しく大きい。そのため、PLA による薬物の吸収促進効果には部位差が生じることが予想される。加えて、腸管部位ごとに細胞間隙に存在する TJ 関連タンパク質の発現の違いや消化酵素の存在も無視することはできない。特に消化酵素の存在は PLA の分解を引き起こすことがこれまでに示されている<sup>38)</sup>。

第 1 章では、腸管上皮細胞においても PLA が吸収促進効果を示すかどうかを確認するために、水溶性高分子モデル薬物である FD-4 の吸収促進効果を *in situ* closed loop 法を用いてラット腸管で評価した。さらに、PLA による吸収促進作用に対する消化酵素の影響をトリプシン阻害剤であるアプロチニンを用いて検

討した。また、腸管各部位において高分子薬物の透過に重要な役割を果たしている occludin の発現量をウエスタンブロット法を用いて評価し、PLA による吸収促進効果の部位差の解明を試みた。

## 第2節 実験方法

### 1-2-1. 試薬

Fluorescein isothiocyanate (FITC) – dextran (MW 3.75 kDa, FD-4), poly-L-arginine (MW44.3 kDa, PLA)、aprotinin from bovine serum 及び urethane を SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO) より購入した。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。BCA protein assay reagent kit 及び Super Signal West Dura Extended Substrate を Thermo scientific (Waltham, MA) より購入した。Mouse anti occludin を Invitrogen (Carlsbad, CA) より購入した。HRP-conjugated goat anti mouse IgG を Santa Cruz (Santa Cruz, CA) より購入した。その他の試薬は特級品を用いた。

### 1-2-2. 動物実験

Wistar 系雄性ラット (8 週齢, BW 250 g – 300 g) を埼玉実験動物供給所 (Saitama, Japan) から購入した。ラットを 3 匹/cage で飼育し、自由に食餌及び水を摂取できるようにした。馴化のために 1 週間飼育し、実験 16 時間前から絶食させた。本研究におけるラットを用いた全ての実験は、城西大学動物実験規定に従い、全学動物実験管理委員会の承認を得て行った。

### 1-2-3. 静脈内投与

Wistar 系雄性ラットの腹腔内に urethane (1 g/kg, 250 mg/mL) を投与し、麻酔した。ラットを固定台に仰臥位固定した後、腸管投与と同様の条件にするため、腸管へ外科的処置を施し、左右の頸静脈を露出した。調製した FD-4 生理食塩液 (2 mg/kg, 2 mg/mL) を右頸静脈より投与した。

#### **1-2-4. *In situ* closed loop 実験**

Wistar 系雄性ラットを urethane (1 g/kg, 250 mg/mL) の腹腔内投与により麻酔した後、開腹手術を行った。胃幽門部から下 5 cm を十二指腸部、胃幽門部から下 10 cm から 15 cm までを空腸部、盲腸の上 5 cm から 10 cm までを回腸部、盲腸より下 5 cm を結腸部とし、それぞれ 5 cm の loop を作製した。作製した loop の両端に切り込みを入れ、37°C に温めた生理食塩液 20 mL と空気 5 mL をシリンジで注入し、各腸管内容物を洗浄除去した。十二指腸への手術の際には、loop 内への胆汁の流入を防ぐため、胆管部にメディカルポリエチレンチューブ (内径 0.28 mm, 外形 0.61 mm) を挿入して作製した Bile fistula から胆汁を体外へ排出させた。FD-4 溶液 (20 mg/kg, 10 mg/mL), PLA (0.05, 0.25 及び 0.5%) 含有 FD-4 溶液 (20 mg/kg, 10 mg/mL), 100 µg/mL aprotinin 含有 FD-4 溶液 (20 mg/kg, 10 mg/mL) 及び 100 µg/mL aprotinin と 0.5% PLA 含有 FD-4 溶液 (20 mg/kg, 10 mg/mL) を各部位の腸管 loop 末端から経口用ゾンデを用いて、腸管 1 cm あたり 100 µL 投与した。体温を維持するために作製したループを体内へ戻し、ミヘル針で閉腹した。

#### **1-2-5. 血漿採取法**

投与後、ヘパリンで処理した注射筒を用いて、左頸静脈より 0.15 mL ずつ経時的 (0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 及び 240 分) に血液を採取した。得られた血液を直ちに遠心分離 (20,400 x g, 5 min, 4°C) し、血漿を得た。

#### **1-2-6. 血漿中 FD-4 濃度測定**

血漿 50 µL をホウ砂リン酸緩衝液 (pH 8.5) で 100 倍希釈し、サンプル中の FD-4 の蛍光強度を分光蛍光光度計 (RF-1500, Shimadzu, Kyoto) を用いて励起波

長 495 nm、蛍光波長 515 nm で測定した。

#### 1-2-7. 動態学的解析

FD-4 の体内動態を 2-コンパートメントモデルに従って解析した。血中濃度を非線形最小二乗法 (アルゴリズム ; Damping Gauss-Newton 法) により解析した。静脈内および腸管内投与における最高血中濃度 ( $C_{\max}$ )、最高血中濃度到達時間 ( $T_{\max}$ ) を血中濃度プロファイルより求めた。モーメント解析法により血漿中濃度-時間曲線下面積 ( $AUC_{0-4h}$ ) を (1) 式から算出した。

$$AUC_{0-4h} = \int_0^4 C dt \quad \cdots (1)$$

ここで、 $C$  は血漿中 FD-4 濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) である。

また、生物学的利用率 ( $F_{0-4h}$ ) を (2) 式より算出した。

$$F_{0-4h}(\%) = \frac{AUC_{\text{test}}/D_{\text{test}}}{AUC_{i.v.}/D_{i.v.}} \times 100 \quad \cdots (2)$$

ここで、 $D_{\text{test}}$  及び  $D_{i.v.}$  はそれぞれ腸管内及び静脈内投与量であり、 $AUC_{\text{test}}$  及び  $AUC_{i.v.}$  はそれぞれ腸管内及び静脈内投与における血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) である。

#### 1-2-8. Immunoblot analysis

ラット腸管 (十二指腸、空腸、回腸、結腸) を 5 cm 摘出し、生理食塩液 20 mL で腸管内を洗浄後、切開した。粘膜側を上にして氷上 phosphate-buffered saline

(PBS) 内に配置した擦りガラスの上に置き、もう一枚の擦りガラスでこすり合わせながら上皮細胞を採取した。採取した腸管上皮細胞を液体窒素で満たした乳鉢に加えて凍結し、ホモジナイズした。Tris buffer 溶液 (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.3 mM EGTA, protease inhibitor cocktail) を 1 mL 加え、26 ゲージの針と注射筒 (1 mL) を用いて全量の吸い取りと吐き出しを 5 回繰り返し、さらにホモジナイズした。そのホモジネートを遠心分離 (1,000 x g, 5 min) し、未破碎細胞などを沈殿させ、上清のみを採取した。その後、上清を超遠心分離 (43,000 x g, 30 min) し、沈殿したペレットを膜フラクションとし、上記の Tris buffer 溶液を加えて再懸濁した。BCA protein assay を用いてタンパク質量を均一に補正した。サンプルを 2 × SDS sample buffer と 1 : 1 の割合で混合し、95°C の水浴で 10 分間加熱し、これを SDS-PAGE のサンプルとした。12% polyacrylamide gel 内へ調製したサンプル 10 μL を添加し、電気泳動を行った (200 V, 40 min)。その後、泳動したゲルを polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に転写した (70 V, 120 min)。PVDF 膜を 3% スキムミルクを含む PBS-T (Phosphate-buffered saline containing 0.1% Tween20) でブロッキング (室温、60 min) した後、PVDF 膜を occludin (1 : 1000) 及び β-actin (1 : 1000) に対する一次抗体を含む PBS-T 中で 4°C で一晩インキュベートした。インキュベート後、PBS-T で 15 分間振盪して洗浄し、これを 3 回繰り返した。続いて、これらの一次抗体に対する二次抗体 (HRP-conjugated anti mouse IgG, 1:1000) を含む PBS-T で PVDF 膜を室温で 1 時間インキュベートした。PVDF 膜を PBS-T で 15 分間振盪して洗浄し、これを 3 回繰り返した。Super Signal West Dura の enhancer solution と stable peroxide solution を 1 : 1 で混合後、PVDF 膜へ塗布し、生じた化学発光を LAS-1000 (GE Healthcare, UK) を用いて検出した。Occludin 及び β-actin のバンド強度を Image J software program (NIH) を用いて定量し、各サンプルの occludin のピクセル強度



を  $\beta$ -actin のピクセル強度で補正した。

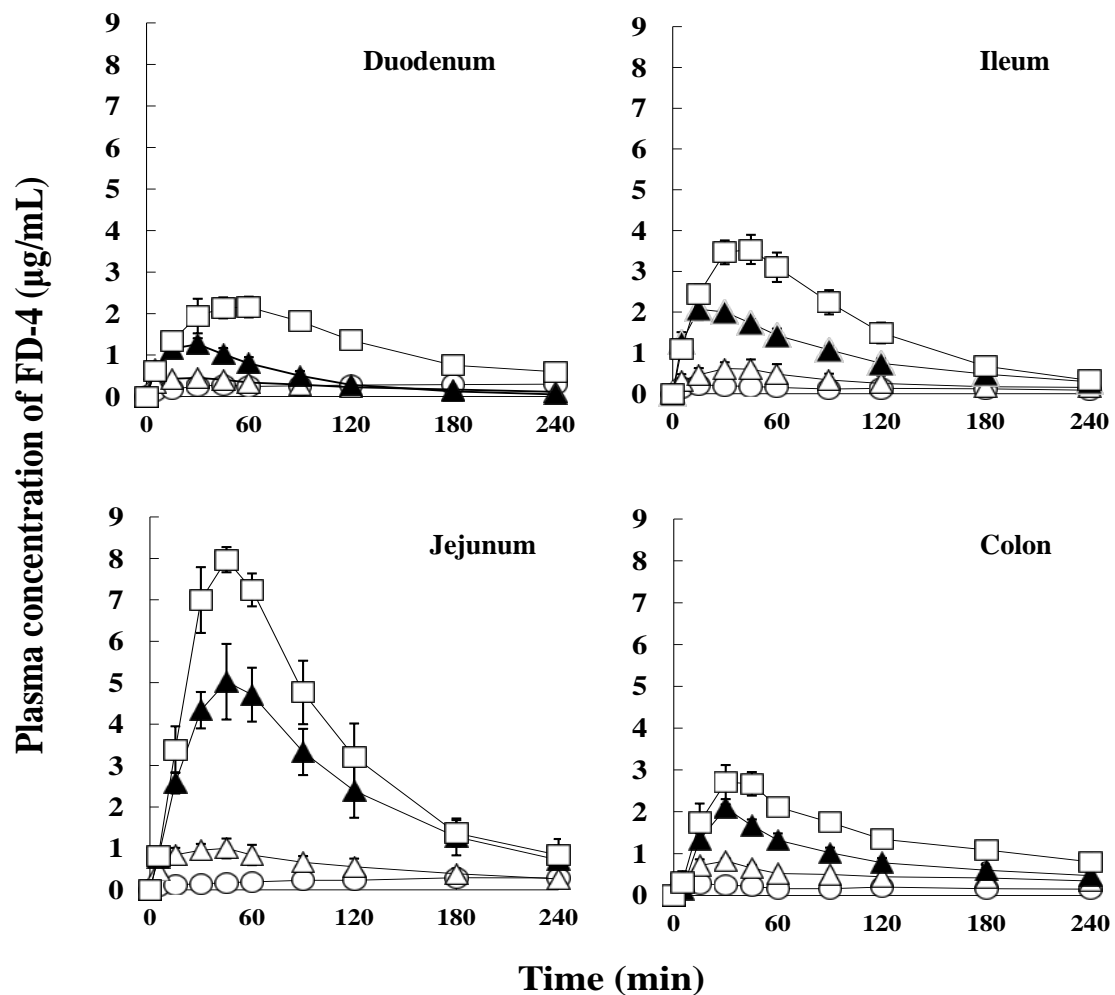
#### **1-2-9. 統計解析**

2 群間の比較には Student's t-test を用いて解析し、 $p < 0.05$  を有意とみなした。

### 第3節 結果

#### 1-3-1. 腸管各部位における FD-4 の吸収に対する PLA の効果

Figure 1 にラット腸管各部位に種々濃度の PLA を FD-4 と共に投与した後の血漿中 FD-4 濃度推移を、Table 1 に得られた FD-4 の動態学的パラメータを示す。全ての腸管部位において、PLA は control と比較して FD-4 の吸収を増大させた。また、PLA の濃度に依存して吸収促進効果は増大した。0.5% PLA を投与した時、腸管各部位のバイオアベイラビリティの順序は、回腸 > 空腸 > 十二指腸  $\geq$  結腸であった。これらの結果は、PLA が濃度依存的に FD-4 の腸管吸収を促進し、さらに、吸収促進効果には部位差があることを示唆している。



**Fig. 1** The plasma concentrations of FD-4 following intra-intestinal administration into the closed-loop in rats.

● : Control (FD-4 only), ○ : FD-4 with 0.05% PLA, △: FD-4 with 0.25% PLA,  
 □ : FD-4 with 0.5% PLA,

Each data point represents the mean and standard error (n=3-7)

**Table 1 Pharmacokinetic parameters of FD-4 following intra-intestinal administration into the closed loop in rats.**

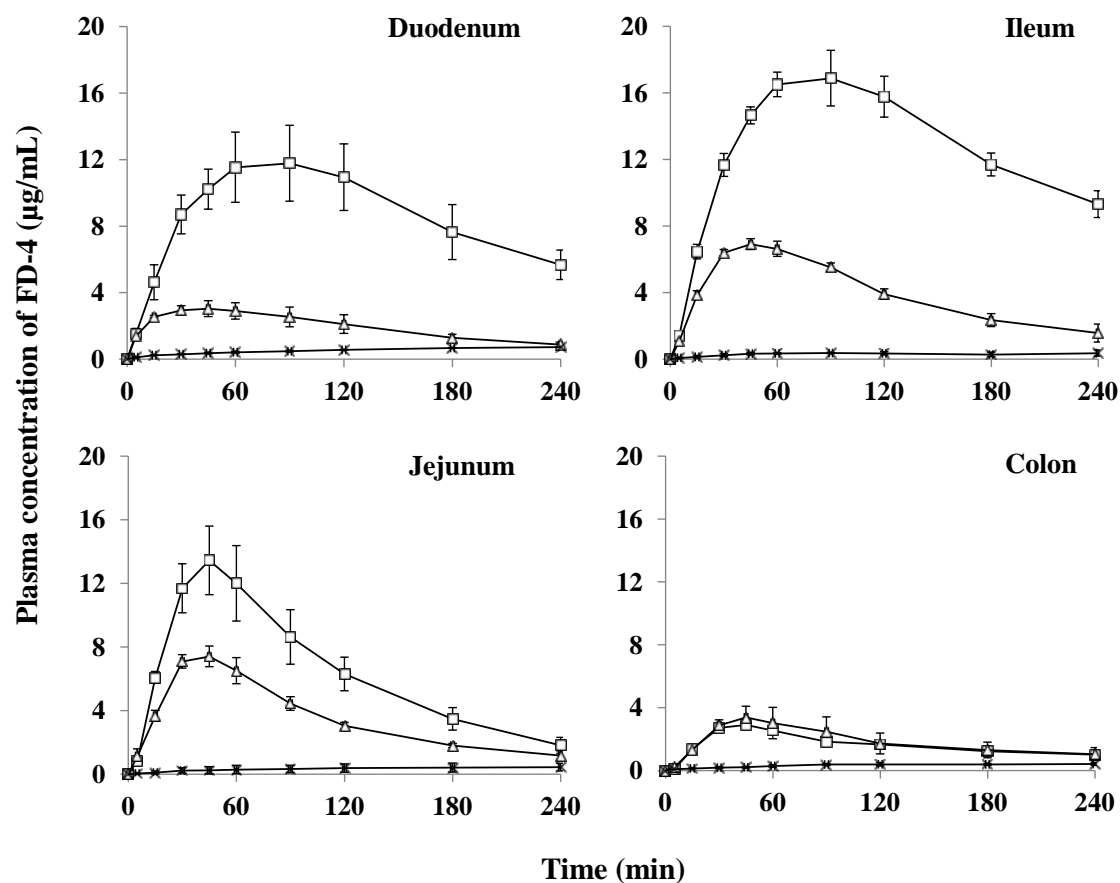
	<b>Dose</b> <b>(mg/kg)</b>	<b>Cmax</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Tmax</b> <b>(min)</b>	<b>AUC<sub>0-4h</sub></b> <b>(µg/mL min)</b>	<b>F<sub>0-4h</sub></b> <b>(%)</b>
<i>i.v.</i>	2			274.9 ± 22.3	-
<b><i>Duodenum</i></b>					
Control	20	0.16 ± 0.02	75 ± 52.7	26.4 ± 5.7	1.09
0.05% PLA	20	0.52 ± 0.08	35 ± 13.2	60.8 ± 21.1	2.05
0.25% PLA	20	1.03 ± 0.10	22 ± 5.8	103.0 ± 33.9	3.96
0.5% PLA	20	3.37 ± 0.41	41.3 ± 6.4	423.9 ± 23.8	17.54
<b><i>Jejunum</i></b>					
Control	20	0.26 ± 0.07	75 ± 52.6	29.6 ± 4.6	1.14
0.05% PLA	20	0.66 ± 0.21	40 ± 5	73.4 ± 16.9	3.40
0.25% PLA	20	2.21 ± 0.18	18.8 ± 3.8	226.5 ± 13.1	10.15
0.5% PLA	20	4.44 ± 0.25	42 ± 2.7	477.6 ± 28.1	17.94
<b><i>Ileum</i></b>					
Control	20	0.36 ± 0.10	85 ± 18.8	56.6 ± 0.97	1.41
0.05% PLA	20	0.86 ± 0.19	40 ± 5	91.07 ± 18.5	6.12
0.25% PLA	20	3.34 ± 0.63	39 ± 7.7	416 ± 14.3	18.49
0.5% PLA	20	8.42 ± 0.36	45 ± 8.7	883.7 ± 65.8	36.12
<b><i>Colon</i></b>					
Control	20	0.28 ± 0.06	125 ± 65	35.1 ± 10.3	1.64
0.05% PLA	20	0.96 ± 0.14	25 ± 5	137.2 ± 2.5	6.67
0.25% PLA	20	2.10 ± 0.09	30 ± 8.66	203.4 ± 44.01	8.80
0.5% PLA	20	2.43 ± 0.23	45 ± 15	359.7 ± 3.09	15.19

**a:  $F_{0-4h} = (AUC_{test} / Dose_{test}) / (AUC_{i.v.} / Dose_{i.v.}) \times 100$**

**Each data represents the mean or mean and standard error (n=3-7).**

### 1-3-2. 腸管各部位における PLA の吸収促進効果に対するタンパク質分解酵素阻害剤の影響

Figure 2 にラット腸管各部位に 0.5% PLA 及び aprotinin を FD-4 と共に投与した後の血漿中 FD-4 濃度推移を、Table 2 に得られた FD-4 の動態学的パラメータを示す。なお、FD-4 は酵素的な分解が認められていない<sup>39)</sup>。0.5% PLA 溶液に aprotinin を加えた FD-4 溶液を投与した場合、十二指腸、空腸及び回腸のいずれの部位においても、0.5% PLA を含む FD-4 と比較して血漿中 FD-4 濃度は増大した。特に十二指腸及び空腸において、バイオアベイラビリティが約 3.5 倍増加した。また、回腸は、1.8 倍程度であった。これに対し、結腸は aprotinin の有無にかかわらず、FD-4 の血中濃度推移がほとんど変化しなかった。この結果は、十二指腸、空腸及び回腸において、FD-4 の吸収促進効果の部位差を生じる要因の一つとして、PLA の分解速度の違いにあることを示唆している。



**Fig. 2 Plasma concentrations of FD-4 following administration at various sites of the intestinal tract in rats.**

×: Control (FD-4), Δ: FD-4 with 0.5 w/v% PLA ,

□ : FD-4 with 0.5 w/v% PLA and 100 µg/mL aprotinin

Each data point represents the mean ± S.E. (n= 3-4).

**Table 2 Pharmacokinetic parameters of FD-4 following intra-intestinal administration into the closed loop in rats.**

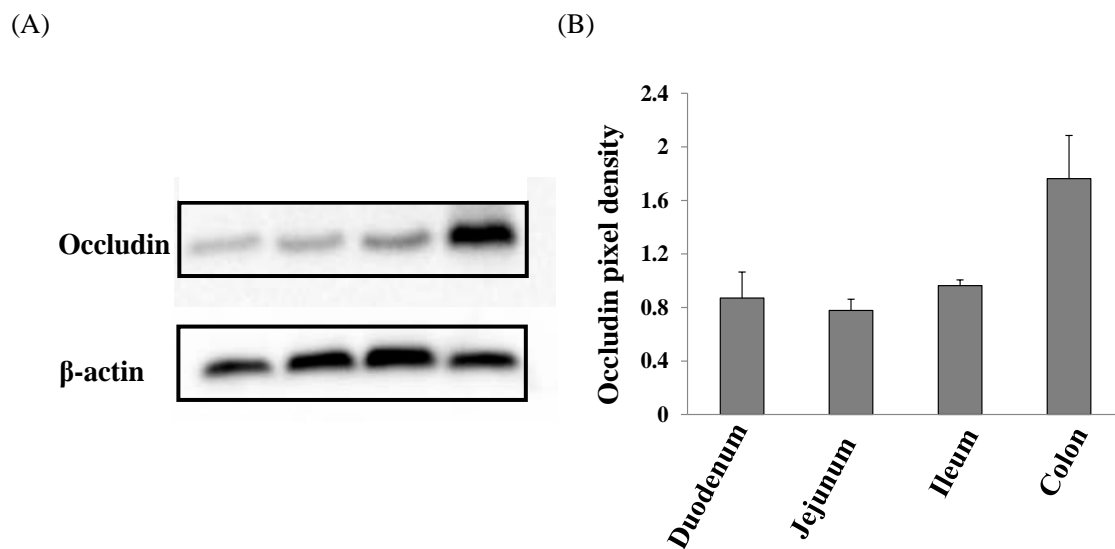
		<b>Dose</b> (mg/kg)	<b>C<sub>max</sub></b> (µg/mL)	<b>T<sub>max</sub></b> (min)	<b>AUC<sub>0-4h</sub></b> (µg/mL · min)	<b>F<sub>0-4h</sub></b> (%)
<b>Duodenum</b>						
	Control	20	0.73 ± 0.02	-	126 ± 4	2.4
	0.5% PLA	20	1.82 ± 1.09	45 ± 8.7	595 ± 110	11.3
	0.5% PLA with aprotinin	20	12.2 ± 1.93	75 ± 15	2086 ± 375	39.7
<b>Jejunum</b>						
	Control	20	0.49 ± 0.05	-	72 ± 19	1
	0.5% PLA	20	6.96 ± 0.29	50 ± 5	934 ± 59	12.3
	0.5% PLA with aprotinin	20	17.5 ± 1.29	80 ± 10	3054 ± 196	40.2
<b>Ileum</b>						
	Control	20	0.46 ± 0.15	-	79 ± 30	2.2
	0.5% PLA	20	7.45 ± 0.60	40 ± 5	831 ± 34	22.9
	0.5% PLA with aprotinin	20	13.4 ± 2.17	45 ± 0	1533 ± 262	42.2
<b>Colon</b>						
	Control	20	0.46 ± 0.07	-	81 ± 15	1.6
	0.5% PLA	20	3.63 ± 0.70	49 ± 4.3	441 ± 138	8.96
	0.5% PLA with aprotinin	20	2.94 ± 0.23	45 ± 8.7	394 ± 95	8

**a:  $F_{0-4h} = (AUC_{test} / Dose_{test}) / (AUC_{i.v.} / Dose_{i.v.}) \times 100$**

**Each data represents the mean or mean and standard error (n=3-7).**

### 1-3-3. 腸管各部位における occludin の発現量

Figure 3 に腸管各部位の上皮細胞における occludin の発現量を示す。ラット腸管各部位の上皮細胞における occludin の発現レベルは、十二指腸、空腸、回腸ではほぼ同等であったが、結腸において強く発現していた。



**Fig. 3 The expression of occludin in the epithelium of the rat intestinal segments.**

(A) Occludin and  $\beta$ -actin were detected by a Western blot analysis.

(B) The densitometry ratios representing the occludin expression in the epithelium.

Each data column represents the mean and standard error (n=9).



## 第4節 小括

ラット腸管各部位において、PLA は濃度依存的に FD-4 の吸収を増加させた。また、PLA は回腸において最も高い吸収促進効果を示し、次いで空腸、十二指腸と結腸の順であった。この結果は鼻粘膜と同様に腸管上皮においても PLA は水溶性高分子薬物の吸収を改善できることを示唆している。

しかし、PLA による FD-4 の吸収促進効果には腸管各部位によって著しい違いが認められた。この吸収促進効果の部位差として考えられる要因には、タンパク質分解酵素量、TJ 関連タンパク質の発現レベル及び吸収表面積が腸管各部位で異なることが挙げられる。結腸の吸収促進効果が最も小さかった主な要因として、吸収表面積が他の部位に比べ小さいことが主な要因と考えられる

以前に、PLA を用いた FD-4 の経鼻吸収実験において、鼻腔内の鼻粘液中に含まれる酵素により、PLA が分解されることが報告されている<sup>39)</sup>。これと同様に腸管上皮にも、膵臓由来のプロテアーゼ及び腸管上皮細胞から分泌されるプロテアーゼによって PLA が分解される可能性がある。そこで、トリプシンやキモトリプシンなどを阻害する aprotinin を用いて、FD-4 の吸収性に対する PLA の効果の検討を行った。その結果、aprotinin 併用により、十二指腸、空腸及び回腸における FD-4 のバイオアベイラビリティは PLA のみの適用と比較して、著しく増大した。この結果は十二指腸、空腸及び回腸において、PLA による吸収促進効果に部位差が生じた主な要因が、消化酵素による PLA の分解であり、腸管各部位での上皮粘液中のタンパク質分解酵素濃度が異なることにより<sup>40,41)</sup>、PLA の吸収促進効果が異なると考えられた。すなわち、消化酵素の多い十二指腸と小腸上部では、aprotinin が PLA を分解する酵素を阻害し、腸管内での PLA の安定性が保たれ、上皮での PLA の濃度が高く維持されたために、吸収促進効果が改善し、FD-4 の血中への移行量が PLA 併用群と比較して増大したと考えられ

た。

一方、結腸では消化酵素の濃度が小さいことから、aprotinin 併用による FD-4 吸収の増大は認められなかったと考えられる。

TJ 関連タンパク質の一つである occludin の発現量は結腸で最も高かったことから、結腸での PLA による吸収促進効果が最も低かったのは、吸収表面積が小さいことに加え、occludin の発現量が高いことも部分的に関与しているかもしれない。

以上より、腸管における PLA の吸収促進効果には部位差があり、それには吸収表面積、消化酵素の分泌量、さらには部分的に occludin の発現量の違いが関係していた。

## 第 2 章 Caco-2 細胞シートにおける経上皮電気抵抗、FD-4 透過性、TJ 関連タンパク質の局在性及び発現量対する PLA の影響

### 第 1 節 小緒言

これまで PLA による透過促進メカニズムの解析は、家兔摘出鼻粘膜及びラット鼻粘膜が用いられてきた。しかし、動物間での抗体の交差性やタンパク質量の不足により、PLA による促進機構の更なる詳細な解析は困難であった。それゆえ、TJ の研究に汎用されている腸上皮を本研究で使用するには、PLA が腸粘膜に対しても鼻粘膜上皮と同様に吸収促進効果を示すことを確認する必要がある。そこで、腸管吸収実験を行った結果、鼻粘膜と同様に PLA は水溶性高分子薬物の吸収を促進したため、PLA による水溶性高分子薬物の吸収促進メカニズムの更なる解析をヒト結腸癌由来の細胞株である Caco-2 細胞を用いて検討することにした。Caco-2 細胞は TJ 関連タンパク質に対する酸化的ストレスや細菌感染の影響に関する研究や吸収促進剤の評価に数多く利用されているため、情報も豊富である。すなわち、Caco-2 細胞は PLA の細胞間隙開口メカニズムを分子生物学的に評価するのに、最適な材料であると考えられた。

そこで第 2 章では、PLA により引き起こされる水溶性高分子薬物の透過促進メカニズムを明らかにするために、Caco-2 細胞シートにおける経上皮電気抵抗、FD-4 透過性及び TJ 関連タンパク質の局在性に対する PLA の影響を検討した。TJ 関連タンパク質として鼻粘膜上皮で検討した occludin 及び ZO-1 に加え、主に低分子薬物やイオンの拡散を制限する重要なタンパク質である 4 回膜貫通タンパク質 claudin-4、3 細胞間での TJ の形成に重要な役割を果たしている tricellulin に関しても評価した。

## 第2節 実験方法

### 2-2-1. 試薬及び抗体

Caco-2 細胞培養時に用いた Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、牛胎児血清 (FBS)、非必須アミノ酸 (NEAA)、Gluta-MAX<sup>TM</sup>-1、Antibiotic-antimycotic、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)、HEPES Buffer Solution (HEPES) 及び Trypsin-EDTA を GIBCO (MD, U.S.A) より購入した。Anti mouse occludin、anti mouse claudin-4、anti rabbit ZO-1、anti rabbit tricellulin、Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG、Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse IgG を Invitrogen (Carlsbad, CA) より、anti rabbit GAPDH、HRP-conjugated Goat anti-mouse IgG、HRP-conjugated Goat anti rabbit IgG を Santa Cruz (Santa cruz, CA) より購入した。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

### 2-2-2. 細胞培養

Caco-2 細胞を American Type Culture Collection (MD, U.S.A) より購入し、実験には継代数 68-78 代の細胞を使用した。CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 5% CO<sub>2</sub> 存在下、37°C で細胞を培養した。1 日もしくは 2 日おきに培地を交換し、細胞がセミコンフルエントの状態に達したとき Trypsin-EDTA を用いて継代した。

Caco-2 細胞 sheet の調製には、polycarbonate 膜製の Transwell (Corning, USA) を使用した。Figure 4 に Transwell の構造を示す。1.0×10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> になるように polycarbonate 膜上に細胞を播種した。培地換えは、実験に用いるまで 1 日もしくは 2 日おきに培地を交換し、21~28 日間培養後に実験に用いた。

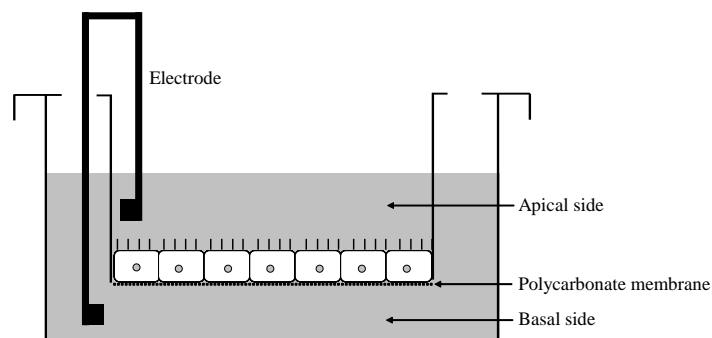


Fig. 4 Transwell used for experimentation.

### 2-2-3. 経上皮電気抵抗 (TEER) の測定

Transwell にて 21-28 日間培養し、TJ を形成した Caco-2 細胞 sheet を、HBSS 溶液にて 2 回洗浄した。洗浄後、Transwell の apical side に 1.5 mL、basal side に 2.6 mL の HBSS 溶液を加え、37°C で 60 分間プレインキュベートした。インキュベーション後に測定した値を初期 TEER とした。なお、TEER の測定は、Millicell<sup>®</sup>-ERS (Millipore, MA, U.S.A) を用いて測定し (Fig. 4)、Caco-2 細胞 sheet の TEER を (3) 式より算出した。測定は、3 回ずつ行い、その平均値をその時間の TEER とした。また、透過実験に用いた Caco-2 細胞 sheet の初期 TEER は、 $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$  以上とした。

$$\text{TEER } (\Omega \cdot \text{cm}^2) = \{(\text{実測値}) - (\text{polycarbonate 膜の抵抗値})\} \times (\text{膜の表面積}) \quad \cdots (3)$$

初期の TEER を測定した後、apical side に種々濃度の PLA を適用し、120 分まで TEER を測定した。

PLA 除去後の TEER の回復の推移を調べるため、120 分経過後、HBSS 溶液で PLA を washout し、apical side に fresh な HBSS 溶液を、basal side に DMEM 培地を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、通常の培

地の培養状態に戻した。24 時間経過後に TEER を測定した後に、培地換えを行い、さらに 24 時間後に TEER を測定した。

FD-4 のみかけの透過係数 (Papp) と TEER の関係を評価するために、TEER から (4) 式により膜コンダクタンス (Gt) を算出した。

$$Gt \text{ (mS/cm}^2\text{)} = 1/\text{TEER (}\Omega\cdot\text{cm}^2\text{)} \quad \cdots (4)$$

#### 2-2-4. FD-4 透過実験

Transwell にて 21-28 日間培養し、TJ を形成した Caco-2 細胞 sheet を、HBSS 溶液にて 2 回洗浄した。洗浄後、Transwell の apical side に 1.5 mL、basal side に 2.6 mL の HBSS 溶液を加え、37°C で 60 分間プレインキュベートした。インキュベーション後、apical side に種々濃度の PLA と 2.5 mg/mL の FD-4 を適用し、apical side より basal side へと透過した FD-4 量を定量した。120 分まで 15 分おきに basal side の溶液を 0.2 mL サンプルングし、その後直ちに fresh な HBSS 溶液を同量添加した。得られたサンプルは、ホウ砂リン酸緩衝液 (0.2 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 0.2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.5) を用いて 100 倍希釈し、分光蛍光光度計を用いて FD-4 の蛍光強度を測定した。測定波長は、励起波長 (Ex) 495 nm、蛍光波長 (Em) 515 nm で行った。FD-4 の Papp を (5) 式より算出した。

$$\text{Papp of FD-4 (cm/sec)} = \frac{dQ/dt}{(A \times C_0)} \quad \cdots (5)$$

ここで、dQ/dt (μg/sec) は FD-4 の定常状態フラックスであり、C<sub>0</sub> (μg/mL) は apical side の FD-4 初濃度、A (cm<sup>2</sup>) は、Caco-2 細胞 sheet の有効表面積である。本実験時間内では sink 条件は保たれている。

#### 2-2-5. FD-4 透過経路の観察

FD-4 透過実験終了後の Caco-2 細胞を HBSS で 2 回洗浄し、細胞を 4% paraformaldehyde-PBS を用いて、室温で 10 分間固定した。固定した細胞をカバーガラスに載せ、退色防止剤である 1,4-diazabicyclo[2.2.2] octane を含む mowiol で封入した。FD-4 の蛍光像を共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV1000, Olympus, Tokyo) を用いて観察した。

#### 2-2-6. MTT assay

種々濃度の PLA を Caco-2 細胞 sheet に 2 時間適用した。その後、細胞シートを HBSS で 2 回洗浄し、MTT 試薬 (1.5 mg/mL) を含む DMEM に置き換え、3 時間インキュベートした。生成したホルマザン色素を dimethyl sulfoxid (DMSO) を用いて溶解した。得られたサンプルの吸光度を GENios microplate reader (Tecan, Mannedorf, Switzerland) を用いて波長 535 nm で測定した。得られた吸光度から (6) 式より Cell viability を算出した。

$$\text{Cell Viability (\%)} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{PLA}}}{\text{Absorbance}_{\text{control}}} \times 100 \quad \cdots (6)$$

#### 2-2-7. Immunofluorescence microscopy

PLA を濃度及び適用時間を変えて処理した Caco-2 細胞を acetone : methanol (1:1) を用いて、4°C で 10 分間固定した。その後、ブロッキング溶液として、3% スキムミルク及び 0.1% Tween-20 を含む Tris buffered saline (10 mM Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, TBS) で 1 時間インキュベートしてから、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体の occludin (dilution, 1:250), ZO-1(dilution, 1:125), claudin-4 (dilution, 1:250) 及び tricellulin (dilution, 1:125) を用いて、4°C で一晩インキュベ

ートした。TBS-T で 15 分間の洗浄を 3 回行い、ブロッキング溶液で希釈した二次抗体 (Alexa fluor 488, 594, dilution, 1:500) で 1 時間インキュベートした後、細胞を再び TBS-T で 15 分間の洗浄を 3 回行った。サンプルをスライドガラスに載せ、退色防止剤を含む mowiol で封入した。サンプルの蛍光を FV1000 を用いて観察した。さらに、TJ 関連タンパク質の蛍光密度を Gopalakrishnan らの方法を用いて定量した<sup>42)</sup>。蛍光画像をランダムに選択し、バックグラウンド値を Image J software program の threshold 機能を用いて補正した。このイメージを反転させ、gray value 値を測定した。得られた値からバックグラウンドの値を引いたものを TJ タンパク質の蛍光密度とした。

#### **2-2-8. Immunoblot analysis**

Caco-2 細胞を HBSS で 2 回洗浄し、RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 1.0% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, protease inhibitor cocktail) を用いてライセートを調製した。サンプル間のタンパク質量を補正するために、BCA protein assay を用いてタンパク質量を測定した。それぞれのサンプルを 2 × SDS sample buffer と同量混合し、95°C で 10 分間加熱した。その後、12% SDS-polyacrylamide gel を用いてタンパク質を分離し(200 V, 40 min)、PVDF 膜へ転写した (70 V, 120 min)。この PVDF 膜を 3% スキムミルクを含む PBS-T で 1 時間インキュベートし、洗浄後、一次抗体である occludin (dilution, 1:1000), ZO-1 (dilution, 1:500), claudin-4 (dilution, 1:1000), tricellulin (dilution, 1:1000) 及び GAPDH (dilution, 1:1000) を用いて、4°C で一晩インキュベートした。PVDF 膜を再び PBS-T で 15 分間洗浄し、これを 3 回行った。洗浄後、これらの一次抗体に対する HRP-conjugated 二次抗体 (dilution, 1:1000) で 1 時間インキュベートした。PVDF 膜を PBS-T で 15 分間洗浄し、これを 3 回行った。洗浄後、PVDF 膜に Super



Signal West Dura を塗布し、生じた化学発光を LAS-1000 を用いて検出した。TJ 関連タンパク質及び GAPDH のバンド強度を Image J software program を用いて定量し、GAPDH で補正を行った。

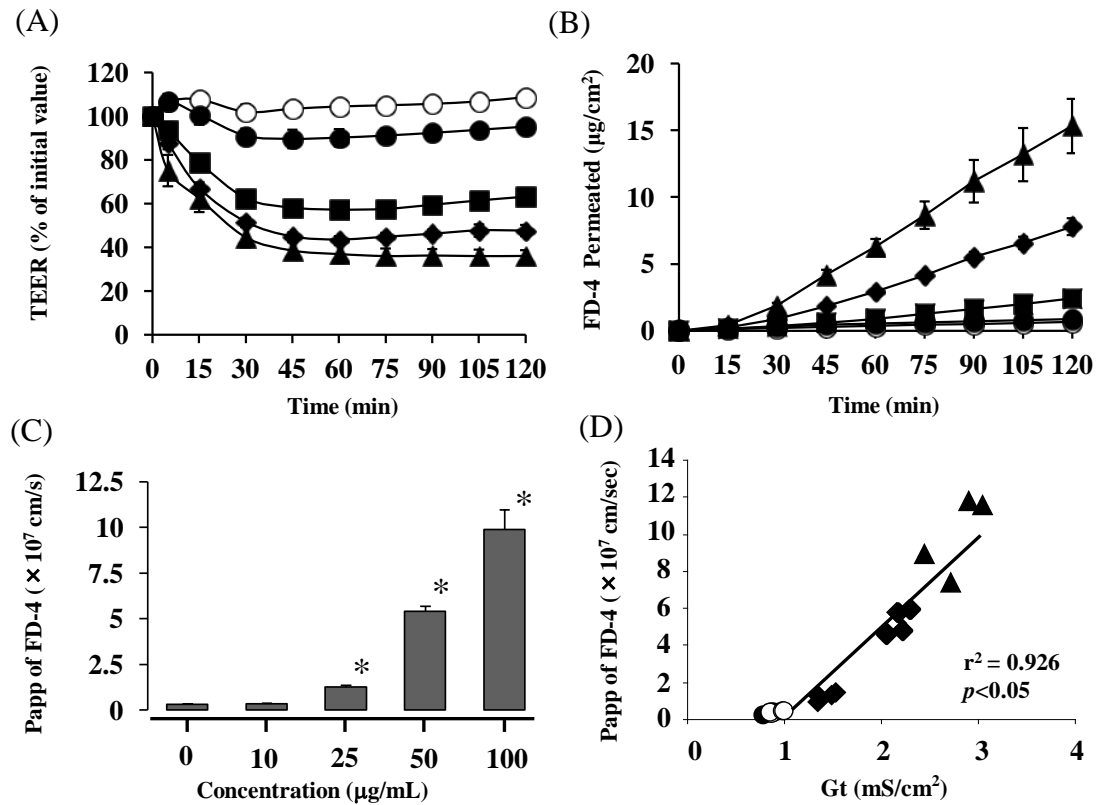
#### **2-2-9. 統計解析**

各群間の差を Dunnett の多重比較検定で解析し、 $p < 0.05$  を有意とみなした。

### 第3節 結果

#### 2-3-1 Caco-2 細胞 sheet における TEER 及び FD-4 透過性に対する PLA の影響

Figure 4A 及び B に 10、25、50 及び 100  $\mu\text{g/mL}$  PLA を Caco-2 細胞の apical side に適用した際の TEER 及び FD-4 透過量を示す。10、25、50 及び 100  $\mu\text{g/mL}$  PLA を Caco-2 細胞 sheet に適用すると、TEER は適用直後より急激に低下し、適用後 45 分までにそれぞれコントロールの 90、58、45 及び 39%になり、PLA の濃度に依存して低下した。一方、種々濃度の PLA を適用したときの FD-4 の透過量は、PLA 濃度の増加に伴い増大した。しかし、10  $\mu\text{g/mL}$  PLA では、FD-4 透過量はほとんどコントロールと変わらなかった。Figure 4C に Fig. 4B の FD-4 透過量から算出した見かけの透過係数 (Papp) を示す。10、25、50 及び 100  $\mu\text{g/mL}$  PLA の適用で、Papp は Control に比べ、それぞれ 1.2、4.0、17 及び 31 倍と高い値を示し、25  $\mu\text{g/mL}$  以上の PLA 適用で、有意に増加した ( $p < 0.05$ )。加えて、FD-4 の Papp と Gt の間には有意な直線関係が認められた (Fig. 4D,  $p < 0.05$ )。

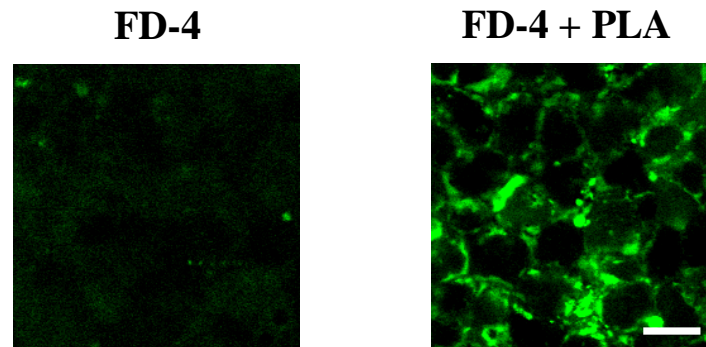


**Fig. 4 Effects of PLA on the TEER and FD-4 permeability in the Caco-2 cell monolayer.**

The change in the TEER (A), amount of FD-4 that crossed the cell layer (B) and the Papp of FD-4 (C) after treatment of Caco-2 monolayers with PLA (○, 0 μg/mL, ●, 10 μg/mL, ■, 25 μg/mL, ◆, 50 μg/mL, ▲, 100 μg/mL). Relationship between Papp of FD-4 and Gt (D).

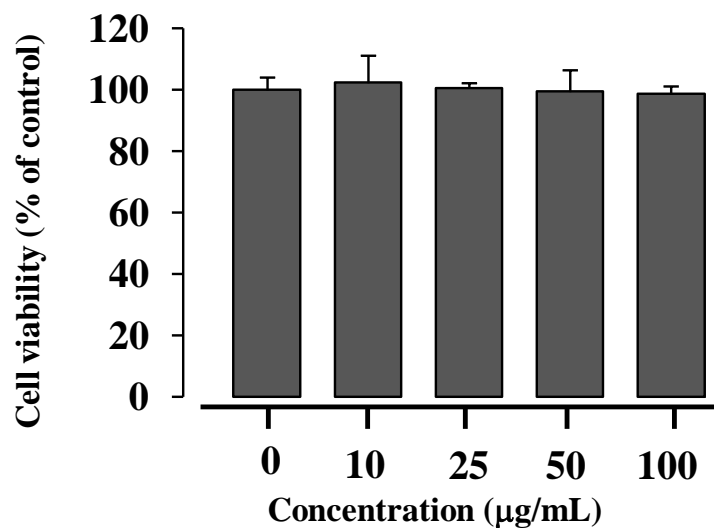
Each data point represents the mean ± S.E. (n=4). \*  $p < 0.05$  vs. Control.

Figure 5 に FD-4 の透過経路を観察した結果を示す。PLA を適用すると、細胞間隙部位に FD-4 の蛍光の濃染像が観察されたが、FD-4 単独適用ではほとんど観察されなかった。



**Fig. 5** Confocal laser scanning microscopic observation of Caco-2 cell monolayers after administration of FD-4 with 100  $\mu\text{g/mL}$  PLA. Bar = 5  $\mu\text{m}$

Figure 6 に種々濃度の PLA を 2 時間適用したときの細胞生存率を示す。いずれの濃度の PLA の適用においても、Caco-2 細胞の生存率はほぼ 100%であり、Caco-2 細胞に対して PLA は少なくとも 100  $\mu\text{g/mL}$  まで細胞傷害性を示さないことが明らかとなった。これらの結果から、Caco-2 細胞 sheet において、PLA は細胞傷害性を示すことなく、細胞間隙経路の開口を介して、FD-4 の透過を促進することが示唆された。



**Fig. 6** Effect of PLA on cell viability.

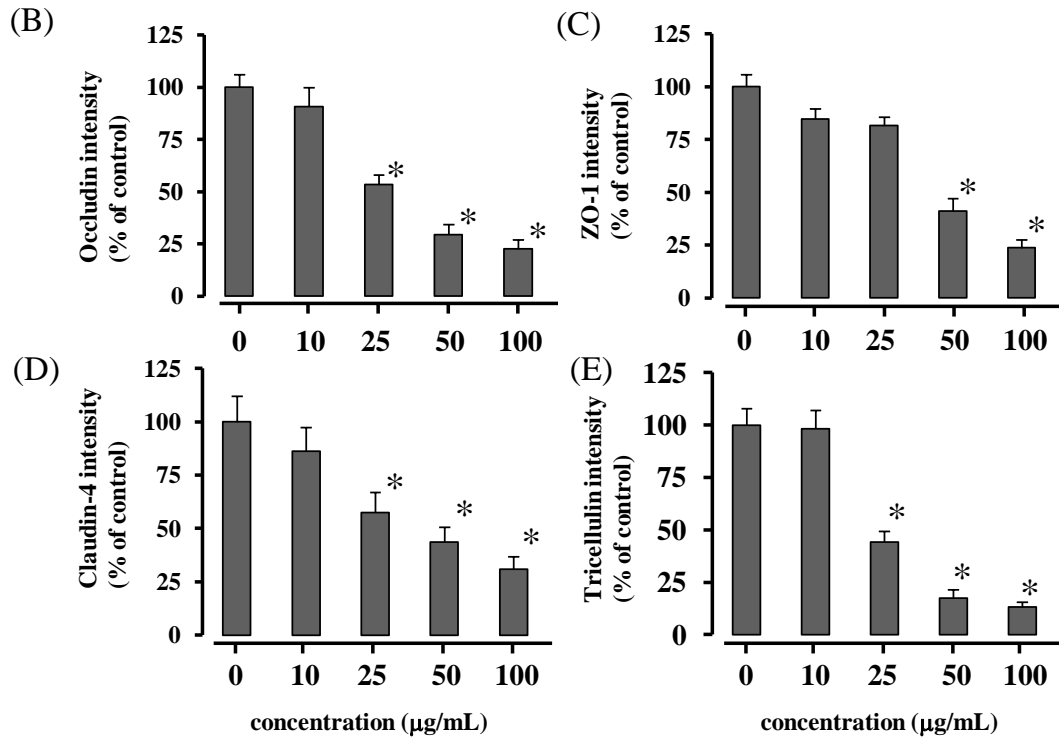
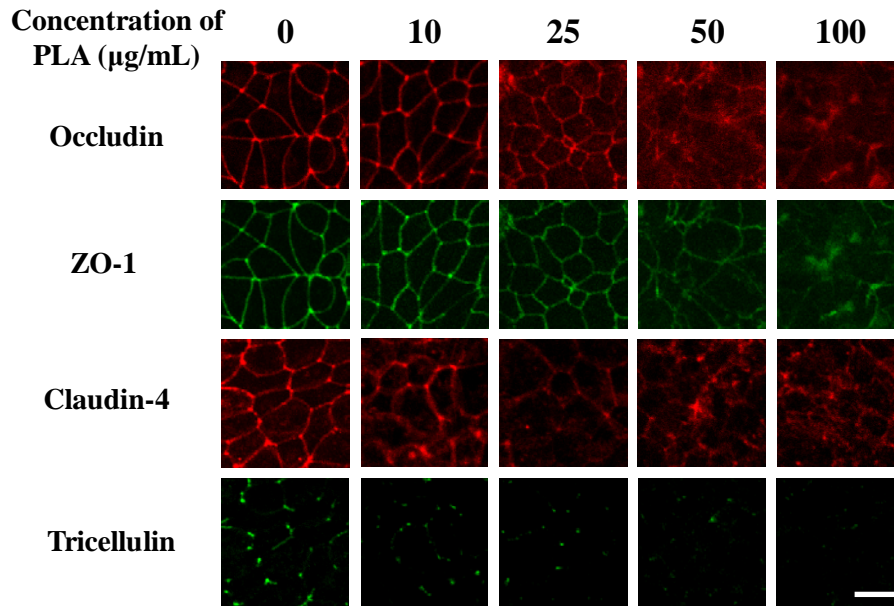
Caco-2 cell monolayers were treated with PLA for 2h  
Each data represents the mean  $\pm$  S.E. (n = 4)

### 2-3-2 Caco-2 細胞 sheet の TJ 関連タンパク質の局在性に対する PLA の影響

Figure 7A に種々濃度の PLA を 2 時間適用した後の occludin、ZO-1、claudin-4 及び tricellulin の免疫蛍光染色画像を、Figs. 7B-E にそれぞれの TJ 関連タンパク質の細胞間隙における蛍光強度を示す。PLA を適用していない (PLA 0  $\mu\text{g/mL}$ ) Caco-2 細胞において、occludin、ZO-1 及び claudin-4 は細胞間隙に局在し、tricellulin は三細胞間に局在していた。一方、種々濃度の PLA の適用により、細胞間隙での TJ 関連タンパク質の局在性は低下した。その効果は PLA 濃度依存的であり、ZO-1 においては PLA 50  $\mu\text{g/mL}$  以上の適用で、その他の TJ 関連タンパク質では、PLA 25  $\mu\text{g/mL}$  以上の適用で有意に低下した ( $p < 0.05$ )。特に、100  $\mu\text{g/mL}$  PLA において、いずれの TJ 関連タンパク質の蛍光は細胞間隙でほとんど観察されなかった。また、FD-4 の透過が有意に増大する PLA 濃度 (25  $\mu\text{g/mL}$ ) において、occludin 及び tricellulin は、claudin-4 や ZO-1 と比較して細胞間隙からの消失が大きかった。

Figure 8A に 50  $\mu\text{g/mL}$  PLA 適用後の occludin、ZO-1、claudin-4 及び tricellulin の局在性の経時的変化を、Figs. 8B-E にそれぞれの TJ 関連タンパク質の細胞間隙における蛍光強度を示す。いずれの TJ 関連タンパク質も PLA の処理時間の延長に伴い細胞間隙部位への局在性が低下し、適用後 30 分以上で有意に低下した ( $p < 0.05$ )。特に occludin と tricellulin の低下が著しく、occludin においては、適用後 15 分以上で有意に低下した ( $p < 0.05$ )。Figure 4B の FD-4 の透過プロファイルの定常状態の直線から X 切片に外挿して得た lag time は約 26 分であり、occludin と tricellulin の蛍光強度が著しく低下したときの時間に近かった。

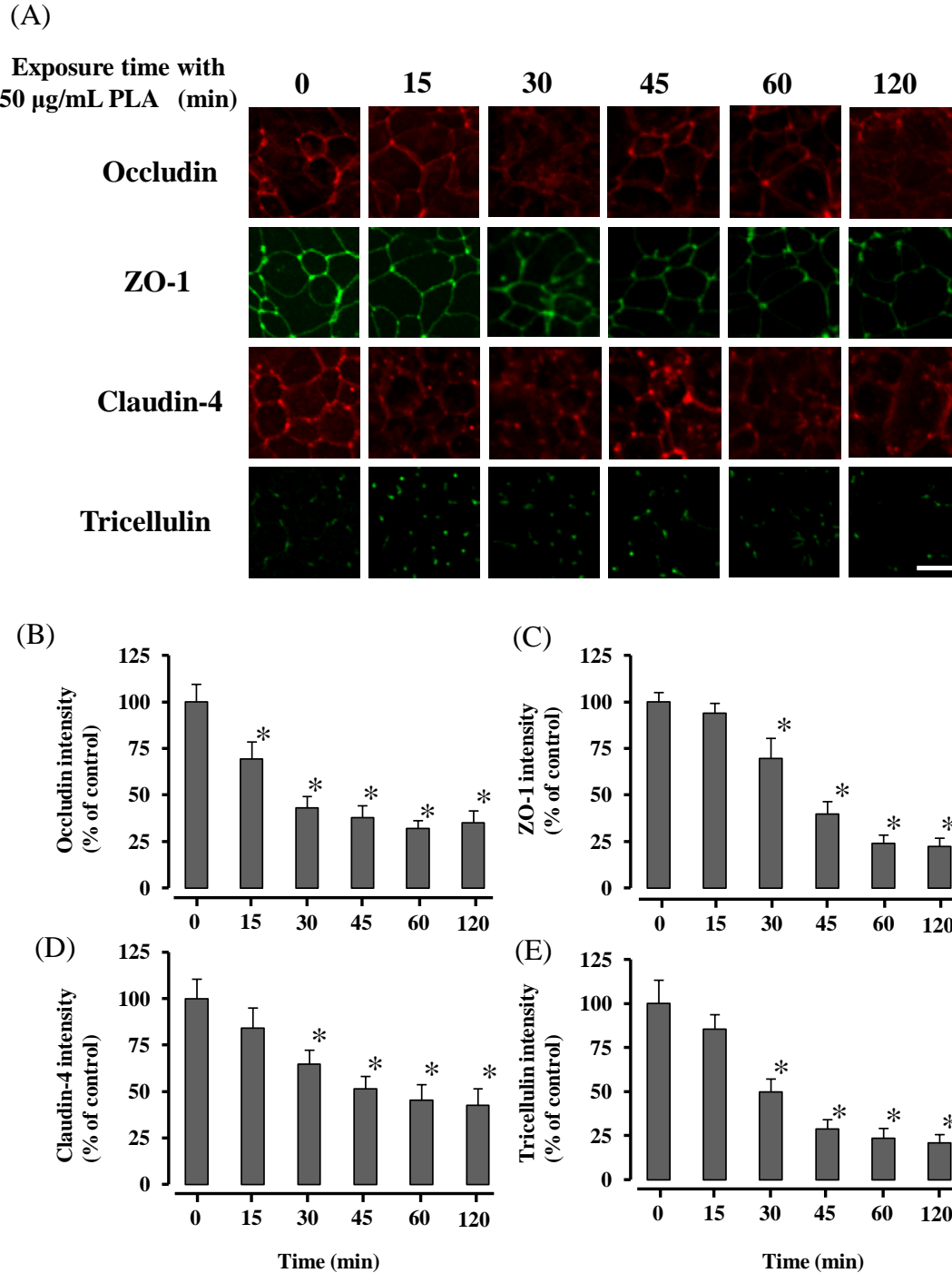
(A)



**Fig. 7 Effects of the PLA concentration on the distribution of tight junction proteins in Caco-2 cell monolayers 120 min after treatment with PLA .**

The tight junction proteins disappeared from the cell–cell contacts in a PLA dose-dependent manner (A). The intensities in all junction proteins were decreased with increasing PLA concentrations (B–E).

Each data point represents the mean  $\pm$  S.E. (n=4). \*  $p < 0.05$  vs. Control.



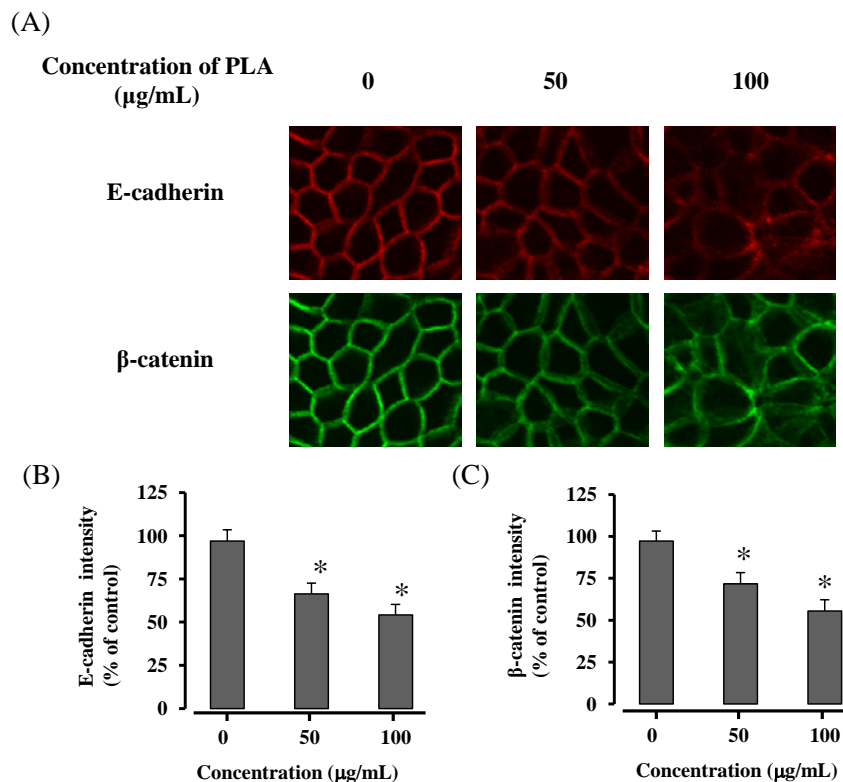
**Fig. 8 Time-dependent alterations in the distribution of tight junction proteins after the application of 50  $\mu$ g/mL PLA to Caco-2 cell monolayers.**

The tight junction proteins disappeared from cell-cell contacts in a time-dependent manner following the treatment with PLA (A). The intensities in all junction proteins were decreased with increasing application times (B–E). Occludin and tricellulin were decreased more than the other proteins (B and E).

Each data point represents the mean  $\pm$  S.E. (n=4). \*  $p < 0.05$  vs. Control.

### 2-3-3 Caco-2 細胞 sheet における AJ 関連タンパク質の局在性に対する PLA の影響

Figure 9A に 50 及び 100  $\mu\text{g/mL}$  PLA 適用後の AJ 関連タンパク質である E-cadherin 及び  $\beta$ -catenin の免疫蛍光染色画像を、Figs. 9B 及び C にそれぞれの AJ 関連タンパク質の細胞間隙での蛍光強度を示す。PLA を適用していない (PLA 0  $\mu\text{g/mL}$ ) Caco-2 細胞において、E-cadherin 及び  $\beta$ -catenin は細胞間隙に局在していたが、PLA の適用により、細胞間隙への AJ 関連タンパク質の局在性は PLA の濃度の増加に伴い有意に低下した ( $p < 0.05$ )。また、PLA による E-cadherin と  $\beta$ -catenin の細胞間隙部位への局在性の低下は同程度であった。



**Fig. 9 Effects of the PLA concentration on the distribution of adherens junction proteins 120 min after treatment of Caco-2 cell monolayers with PLA .**

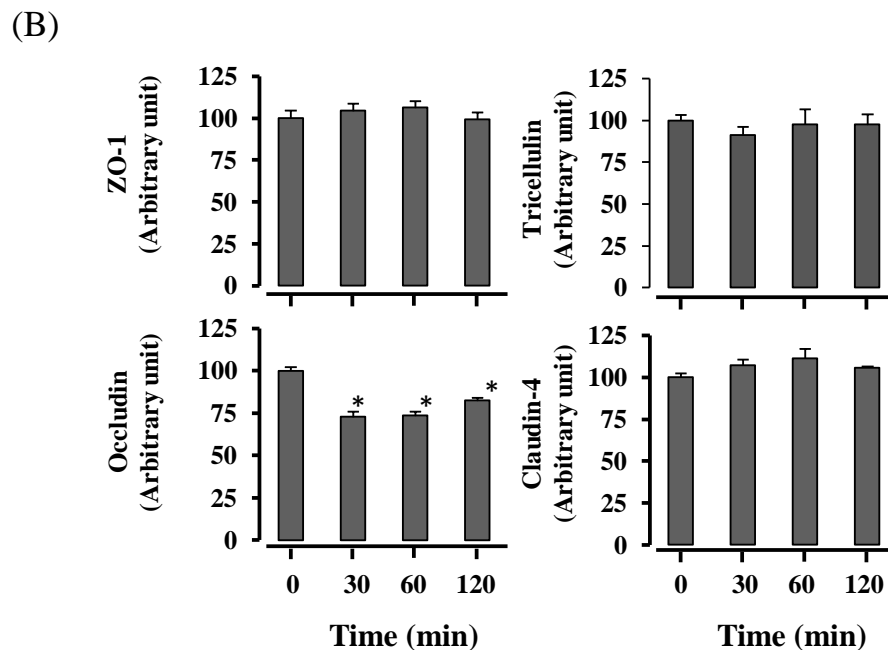
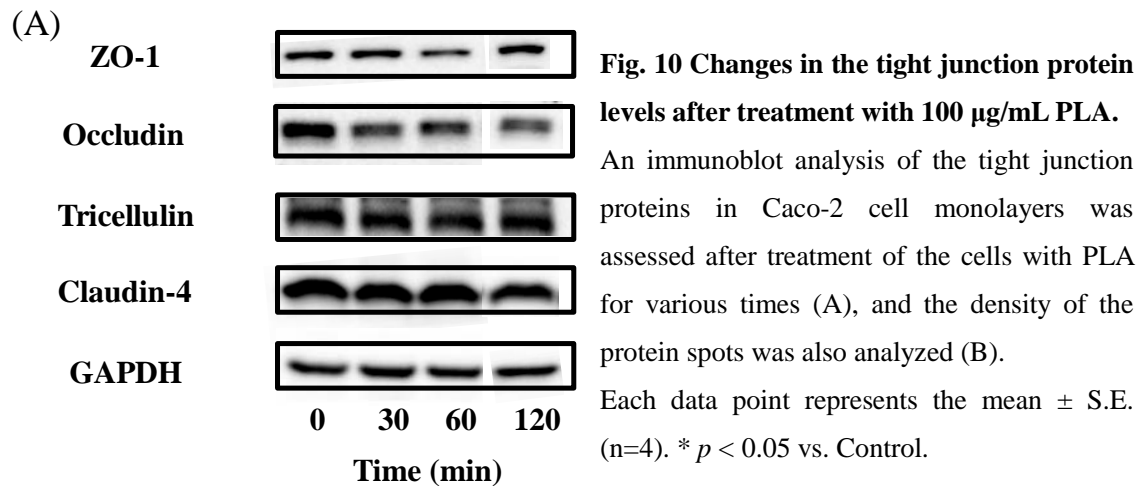
Adherens junction proteins disappeared from the cell–cell contacts in a PLA dose-dependent manner (A). The intensities of the expression of all junction proteins were decreased with increasing PLA concentrations (B and C).

Each data point represents the mean  $\pm$  S.E. (n=4). \*  $p < 0.05$  vs. Control.



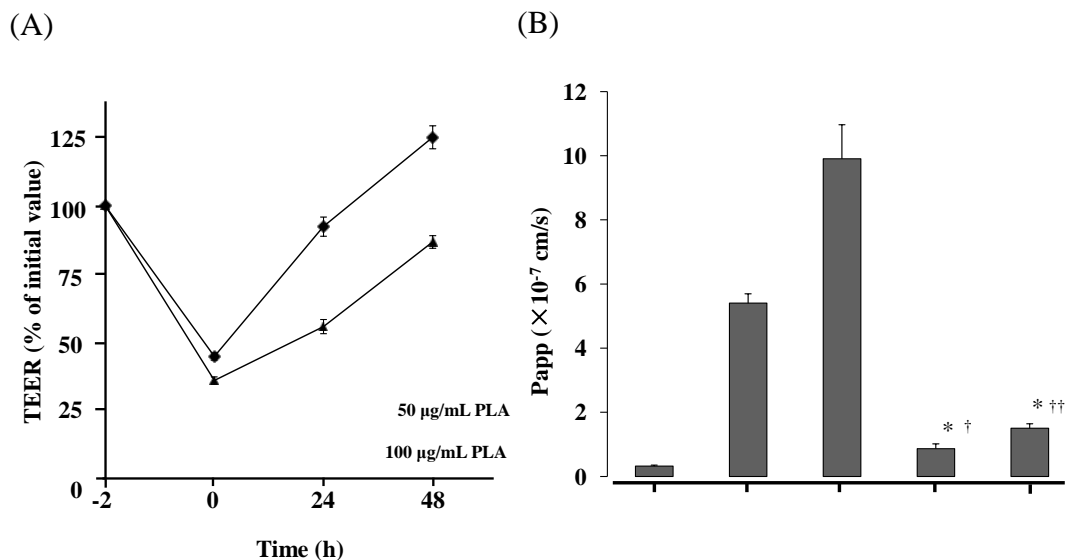
#### 2-3-4 Caco-2 細胞 sheet における TJ 関連タンパク質の発現量に対する PLA の影響

Figure 10A に 100  $\mu\text{g/mL}$  PLA 適用後の occludin、ZO-1、claudin-4 及び tricellulin のイムノブロット解析の結果を、Fig. 8B にそれぞれの TJ 関連タンパク質のシグナル強度を示す。ZO-1、claudin-4 及び tricellulin においては PLA を適用しても、これら TJ 関連タンパク質の発現量はコントロールと比較して有意な変化は認められなかった。一方、occludin については PLA 適用後 30 分以上で、その発現量は有意に低下したが ( $p < 0.05$ )、その強度は 75%程度であった。



### 2-3-5 PLA による透過促進効果の可逆性の検討

PLA による TEER の低下や FD-4 の透過促進、TJ 関連タンパク質の局在性の変化は PLA の除去により、可逆性を示すかどうかを、50 及び 100  $\mu\text{g/mL}$  の PLA を Caco-2 細胞シートに 2 時間適用後、HBSS で洗浄・除去することにより評価した。Figs. 11A 及び B にそれぞれ PLA 除去後の TEER の変化及び FD-4 の Papp を示す。PLA の除去により、TEER は徐々に回復した。特に 50  $\mu\text{g/mL}$  PLA 適用では除去 24 時間ではほぼ完全に回復した。一方、100  $\mu\text{g/mL}$  PLA 適用では 48 時間で Control の 80% 程度であった。PLA 除去後 24 時間での FD-4 の Papp は、50 及び 100  $\mu\text{g/mL}$  PLA 適用のいずれにおいても、適用時と比較して著しく低下することが示された。

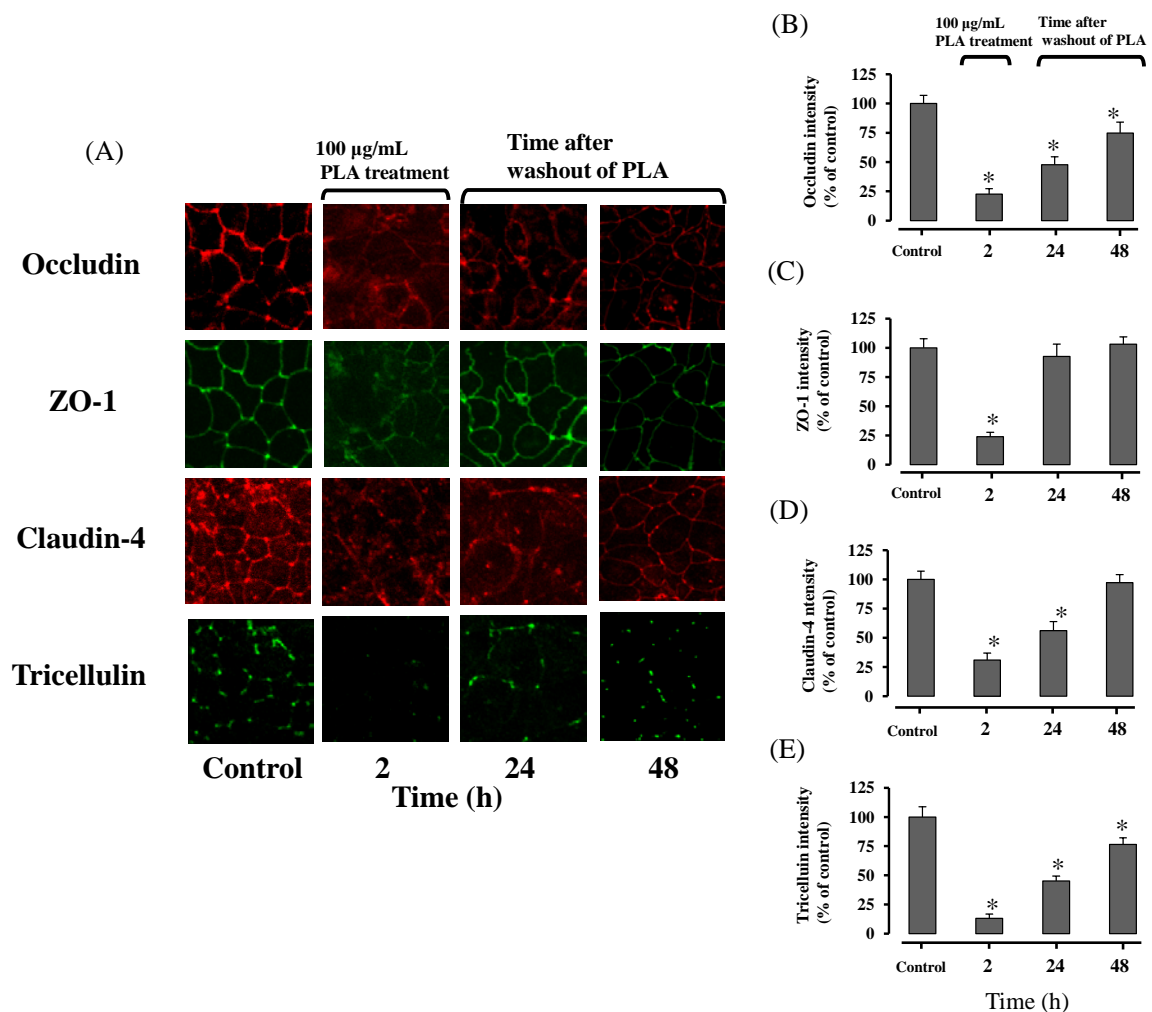


**Fig. 11 Recovery of the TEER and FD-4 permeation.**

After removal of PLA from the Caco-2 cell monolayers, the TEER values increased (A), and FD-4 permeation was significantly decreased

Each data point represents the mean  $\pm$  S.E. (n=4). \*  $p < 0.05$  vs. Control.

Figure 12A 及び B-E にそれぞれ PLA 除去後の occludin、ZO-1、claudin-4 及び tricellulin の局在性及び細胞間隙でのそれら TJ 関連タンパク質の蛍光強度の変化を示す。いずれの TJ 関連タンパク質においても、PLA を除去することにより、細胞間隙部位に戻る事が明らかとなった。特に細胞間隙への ZO-1 の再局在化が速かった。Claudin-4 は 48 時間後、ほぼ 100% 近くまで回復した。一方、occludin 及び tricellulin は 48 時間においても、完全には回復しなかった。

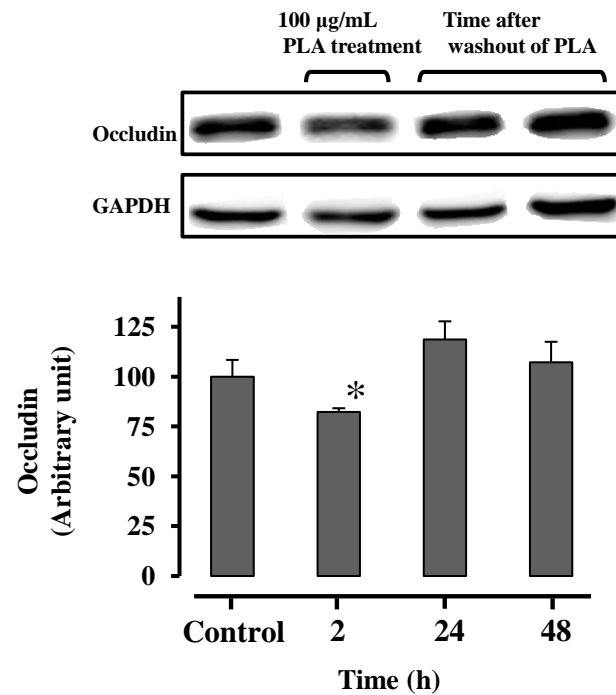


**Fig. 12 Recovery of redistribution of tight junction proteins after removal of PLA from Caco-2 cell monolayers.**

Tight junction proteins were redistributed to the cell-cell contact (A), and the expression level of the tight junction proteins recovered (B-E).

Each data point represents the mean  $\pm$  S.E. (n=4). \*  $p < 0.05$  vs. Control.

Figure 13 に PLA 除去後の occludin の発現量の変化を示す。PLA の 2 時間の適用により減少した occludin の発現量は、PLA 除去後 24 時間で完全に PLA 適用前の発現量にまで回復していた。



**Fig. 13 Recovery of the occludin expression level after removal of PLA from Caco-2 cell monolayers.**

An increased occludin level was detected by the immunoblot and densitometric analyses after the removal of PLA .

Each data point represents the mean  $\pm$  S.E. (n=4). \*  $p < 0.05$  vs. Control.

## 第4節 小括

本章では、TranswellでCaco-2細胞を培養し、コンフルエントに達した細胞 sheet を用いて、細胞間隙経路の開口マーカである TEER 及び FD-4 の透過性、さらには TJ 関連タンパク質の occludin 及び ZO-1 に加えて、これまでに検討されなかった claudin-4 及び tricellulin の局在性や発現量に対する PLA の影響を評価した。

Caco-2 細胞 sheet においても、家兎摘出鼻粘膜やラット鼻粘膜と同様に、PLA は FD-4 の透過量を増大し、そして TEER は低下した。さらに、これらの効果は PLA の適用濃度に依存した。さらに、種々濃度の PLA を適用後に得られた Papp と Gt に良好な相関が得られたことに加え、FD-4 の蛍光画像から得られた透過経路は細胞間隙であることが示された。これらの結果は、Caco-2 細胞においても PLA は細胞間隙経路を開口して、FD-4 の透過を促進することを示唆している。

さらに、TJ 関連タンパク質の局在性を評価した結果、PLA が家兎摘出鼻粘膜の occludin 及び ZO-1 に対して影響を与えたように、Caco-2 細胞シートにおいても同様な効果を示し、その効果は濃度依存的かつ時間依存的であった。さらに、claudin-4 及び tricellulin に関しても、PLA は濃度依存的かつ時間依存的にそれらの局在性に影響を与え、細胞間隙部から消失させた。Figures 7 及び 8 の結果、並びに lag time の評価から、occludin 及び tricellulin は ZO-1 及び claudin-4 と比較して TJ 部からの消失量が大きいこと、FD-4 の透過速度が増大する時間と、occludin 及び tricellulin の消失速度が有意に早くなる時間が一致することから、occludin 及び tricellulin の TJ 部からの経時変化が水溶性高分子薬物の透過促進において極めて重要であると思われる。

一方、PLA は AJ 関連タンパク質の E-cadherin 及び  $\beta$ -catenin に対しても、その局在性に影響を与えたが、TJ 関連タンパク質よりもその影響は小さかった。

TJ 関連タンパク質のうち、claudin-4、tricellulin 及び ZO-1 の発現量は、PLA の適用でほとんど変化せず、occludin もわずかに減少した程度であった。これらの結果は、評価した TJ 関連タンパク質が、PLA の適用により細胞間隙部から消失するのは、それらの分解によるものではなく、細胞内への内在化によることを強く推察させる。

PLA の効果の可逆性を評価した結果、PLA 除去後、TEER の上昇、FD-4 透過量の減少が認められた。加えて、TJ 関連タンパク質の局在性や発現量が適用前の状態に回復することが観察された。このことは、PLA の作用が可逆的であることを示唆している。興味深いことに、PLA 除去後において TJ 関連タンパク質の ZO-1 が最も速く細胞間隙部に再局在し、これは ZO-1 が TJ の再構築・再形成において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

## 第2編 PLAによる TJ 関連タンパク質の細胞間隙部位からの消失機構

### 第1節 小緒言

前編の結果から、細胞間隙部位に分布している TJ 関連タンパク質の occludin, ZO-1, claudin-4 及び tricellulin は、PLA を適用することにより細胞間隙部位から消失し、それは主に内在化によると推察された。しかし、PLA による TJ 関連タンパク質の消失がどのようなメカニズムによるのかはこれまでに報告されていない。従って、この消失機構を解明することは、PLA による透過促進メカニズムの極めて有用な情報を提供できる。

TJ 関連タンパク質の細胞間隙部位からの消失に関して、少なくとも 3 つの経路の寄与を考えることができる。1 つ目として、TJ 関連タンパク質の mRNA レベルの減少を引き起こすことである。TJ 関連タンパク質の mRNA レベルの減少に伴い、合成される TJ 関連タンパク質が減少し、TJ ヘリクルートされるタンパク質量が低下し、結果として、細胞間隙部での TJ の形成が不完全になる経路である。このような機構による TJ の破綻は短時間では引き起こされず、24~48 時間かけて徐々に TJ が破綻する<sup>30)</sup>。しかし、PLA は TJ 関連タンパク質を減少させないことに加えて、細胞間隙からの迅速な TJ 関連タンパク質の消失を引き起こすために、mRNA の減少を介した TJ の破綻を導かないことが容易に想像できる。

2 つ目として、TJ 関連タンパク質が細胞間隙部位において分解される経路である。この TJ の分解経路として代表的なものに、タンパク質分解酵素の matrix metalloproteinases (MMPs) が挙げられる。特に、MMP-2 や MMP-9 が TJ の破綻に

重要な役割を果たしていることが報告されている<sup>43,44)</sup>。しかし、第1章第2節のウェスタンブロットの結果より、TJ 関連タンパク質の分解はほとんど観察されなかった。従って、MMPs を介した細胞間隙の開口も、PLA による水溶性高分子薬物の透過促進メカニズムに深く関わっていないことが推察される。

3 つ目のメカニズムとしては、エンドサイトーシス機構が挙げられる。エンドサイトーシスは細胞外の物質の取り込み及び受容体のような膜タンパク質を細胞膜から細胞内へ輸送する経路である。エンドサイトーシスは、細胞間隙部に存在する TJ 関連タンパク質の内在化も引き起こすことが知られている<sup>45)</sup>。従って、PLA による TJ 関連タンパク質の消失には、エンドサイトーシス経路に関わる可能性が最も高い。

TJ 関連タンパク質のエンドサイトーシス機構には主に、クラスリン介在性エンドサイトーシス、カベオラ介在性エンドサイトーシス及びマクロピノサイトーシスがある。これらのエンドサイトーシス機構はそれぞれ異なる。クラスリン介在性エンドサイトーシスにおいて重要な役割を果たすタンパク質としては clathrin が知られており、クラスリンが clathrin coated pit と呼ばれるタンパク質複合体を形成し、タンパク質を包み込み、内在化させる。カベオラ介在性エンドサイトーシスは、カベオリンと呼ばれるタンパク質がカベオラと呼ばれる膜ドメインを形成し、タンパク質を取り込む。また、マクロピノサイトーシスはクラスリン及びカベオラ介在性エンドサイトーシスのように細胞膜が陥没することにより目的とするタンパク質を取り込むのではなく、細胞膜周辺のアクチンフィラメントが重合し、細胞外へ細胞膜が突き出し、目的とするものを取り囲んで、細胞内へ取り込む。

これまでに、TJ 関連タンパク質の内在化機構にこのようなエンドサイトーシスが重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。その例として、細



胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の除去や VEGF を介した TJ の破綻は、クラスリン介在性エンドサイトーシスを介した TJ 関連タンパク質の内在化により引き起こされることを報告している<sup>45,46)</sup>。さらに、サイトカインの一種であるケモカインの CCL2 はカベオラ介在性エンドサイトーシスを介して、occludin 及び claudin-5 を内在化させることを報告している<sup>47)</sup>。加えて、IFN- $\gamma$  はマクロピノサイトーシスにより occludin を内在化する<sup>48)</sup>。従って、TJ 関連タンパク質はいずれのエンドサイトーシス経路においても内在化される。

さらに、エンドサイトーシス機構により内在化された物質は、細胞内においてエンドソームと呼ばれる特異的なコンパートメントへ輸送される。この輸送の第一段階として、まず、初期エンドソームへ輸送される。初期エンドソームへ輸送された物質は次の 2 つの経路のいずれかに輸送される。その 1 つの経路に後期エンドソームがあり、もう 1 つの経路にはリサイクリングエンドソームがある。初期エンドソームから輸送された物質が後期エンドソームに輸送されると、その後リソソームに運ばれ、最終的に分解される。一方、初期エンドソームからリサイクリングエンドソームへ輸送される場合、再び細胞膜へ輸送されることが知られている。これらの経路は内在化された物質の細胞内での運命を握っている<sup>49)</sup>。

第 2 編では、PLA の適用による TJ 関連タンパク質の消失機構とエンドサイトーシス経路の関与を明らかにするために、3 つの主要なエンドサイトーシス経路の阻害剤を用いて、TEER、FD-4 透過性及び TJ 関連タンパク質の局在性に対する PLA の影響を検討した。さらに、消失した occludin の細胞内での局在性を明らかにするために、各エンドソームに特異的に局在するタンパク質との共局在性を調べた。

## 第2節 実験方法

### 3-2-1 試薬及び抗体

Poly-L-arginine (MW 44,300)、fluorescein-isothiocyanate dextran (FD-4, MW 3,850)、monodansyl cadaverine (MDC)、filipin、methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) 及び waortmannin (Wort) を Sigma Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。Erythritol を和光純薬工業 (Osaka, Japan) から購入した。Chlorpromazine (CP) を Merck (Billerica, MA) から購入した。Mouse anti occludin、anti mouse claudin-4、rabbit anti ZO-1、rabbit anti tricellulin、chicken anti EEA1、Alexa fluor 488 anti chicken IgG、Alexa Fluor 594 donkey anti mouse IgG、Alexa Fluor 633 goat anti rabbit IgG を Invitrogen (Carlsbad, CA) から、rabbit anti LAMP-1 を Millipore (Billerica, MA) より購入した。

### 3-2-2 細胞培養

2-2-2 と同様の方法で調製した。

### 3-2-3 エンドサイトーシス阻害剤含有溶液の調製並びに適用

クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤である CP を distilled water を用いて、MDC を DMSO を用いて溶解し、それぞれ 30 mM 及び 300 mM の溶液を調製した。カベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤である filipin を DMSO を用いて 5 mM の濃度となるよう溶液を調製した。M $\beta$ CD は HBSS を用いて 10 mM の溶液を調製した。マクロピノサイトーシスの阻害剤である Wort を DMSO を用いて 100  $\mu$ M の溶液を調製した。CP、MDC、filipin 及び Wort 溶液を HBSS を用いて 1000 倍希釈し、実験に用いた。Table 3 に実験に用いた各エンドサイトーシス阻害剤の濃度を示す。

Table 3 Endocytosis inhibitors and effect.

Inhibitor	Concentration	Class of endocytosis pathway
Filipin	5 $\mu$ M	Caveolae- mediated endocytosis
M $\beta$ CD	5 mM	
Wort	100 nM	Macropinocytosis
CP	30 $\mu$ M	Clathrin-mediated endocytosis
MDC	300 $\mu$ M	

#### 3-2-4 TEER 測定並びに FD-4 透過実験

Transwell にて 21-28 日間培養し、TJ を形成した Caco-2 細胞単 sheet を、HBSS 溶液にて 2 回洗浄した。洗浄後、Transwell の apical side に 1.5 mL、basal side に 2.6 mL のエンドサイトーシス阻害剤を含む HBSS 溶液を加え、60 分間インキュベートした後に TEER を測定し、初期 TEER とした。Apical side に 100  $\mu$ g/mL PLA 及び 2.5 mg/mL FD-4 を適用後、0, 15, 30, 45, 60, 90 及び 120 分に TEER の測定並びに basal side の溶液を 0.2 mL サンプルングし、その後直ちに同様のエンドサイトーシス阻害剤を含む fresh な HBSS 溶液を同量添加した。TEER の測定を、第一章第二節と同様な方法で行い、膜コンダクタンス(Gt) を算出した。得られたサンプル中の蛍光強度を、2-2-4 と同様の方法で測定し、得られた累積透過挙動から FD-4 の Papp を算出した。得られた Gt 及び Papp のコントロールを 1 としたときの相対比を算出した。

### 3-2-5 Erythritol 透過実験

Transwell にて 21-28 日間培養し、TJ を形成した Caco-2 細胞 sheet を、HBSS 溶液にて 2 回洗浄した。洗浄後、Transwell の apical side に 1.5 mL、basal side に 2.6 mL のエンドサイトーシス阻害剤である CP を含む HBSS 溶液を加え、60 分間インキュベートした。後に TEER 測定し、値を初期 TEER とした。Apical side に 100 µg/mL PLA と 45 mM erythritol を適用し、120 分まで経時的に TEER の測定並びに basal side の溶液を 0.2 mL サンプリングし、その後直ちに CP を含む fresh な HBSS 溶液を同量添加した。TEER の測定を第一章第二節と同様の方法で行い、Gt を算出した。得られたサンプル中の erythritol の測定を Seki らの方法を用いて<sup>47)</sup>、Carged Aerosol Detector (CAD, ESA Biosciences, MA, USA) を接続した HPLC 装置で行った。HPLC 条件を Table 4 に示す。移動相には、脱気した milli-Q を用いた。溶離を流速 0.5 mL/min (Pump A)、カラム温度 80°C で行い、溶離後に、流速 0.5 mL/min (Pump B) の acetonitril と混合し、CAD を用いて定量した。Erythritol の Papp を 2-2-4 と同様の方法で算出した。

Table 4 HPLC conditions for quantitative analysis of erythritol.

Column temperature	80 °C
Mobile phase	Milli-Q
Flow rate	Pump A: 0.5 mL/min, Pump B: 0.5 mL/min
Injection volume	20 µL

### **3-2-6 Immunofluorescence microscopy**

#### **3-2-6-1 細胞間隙部における TJ 関連タンパク質の局在の検討**

Caco-2 細胞 sheet を HBSS 溶液にて 2 回洗浄し、Transwell の apical 側に 1.5 mL、basal 側に 2.6 mL の HBSS またはエンドサイトーシス阻害剤を含む HBSS 溶液を加え、60 分間インキュベートした。インキュベーション後に細胞の apical 側に 100 µg/mL PLA を添加し種々時間インキュベートした。インキュベーション後に Caco-2 細胞を HBSS で 2 回洗浄し、acetone : methanol (1:1) を用いて、4°C で 10 分間固定した。その後、TJ 関連タンパク質を 2-2-7 と同様の方法で処理した。

#### **3-2-6-2 細胞内局在の検討**

Caco-2 細胞 sheet を HBSS にて細胞を 2 回洗浄し、4% paraformaldehyde を含む PBS を用いて、室温で 15 分固定した。固定後、0.1% Triton X-100 を含む PBS で 10 分間膜透過処理を行った。その後、1 時間ブロッキングを行った。インキュベーション後にブロッキング溶液で希釈した TJ 関連タンパク質の occludin とエンドソームタンパク質のマーカーである EEA1, LAMP-1 及び Rab11 の抗体溶液を用いて、4°C で一晩インキュベートした。TBS-T で 15 分間の洗浄を 3 回行い、ブロッキング溶液で希釈した二次抗体 Alexa fluor 488 anti rabbit IgG、Alexa fluor 488 anti chicken IgG 及び Alexa fluor 594 anti mouse IgG で 1 時間インキュベートした。その後は 2-2-7 と同様の方法で処理した。

### **3-2-7 統計解析**

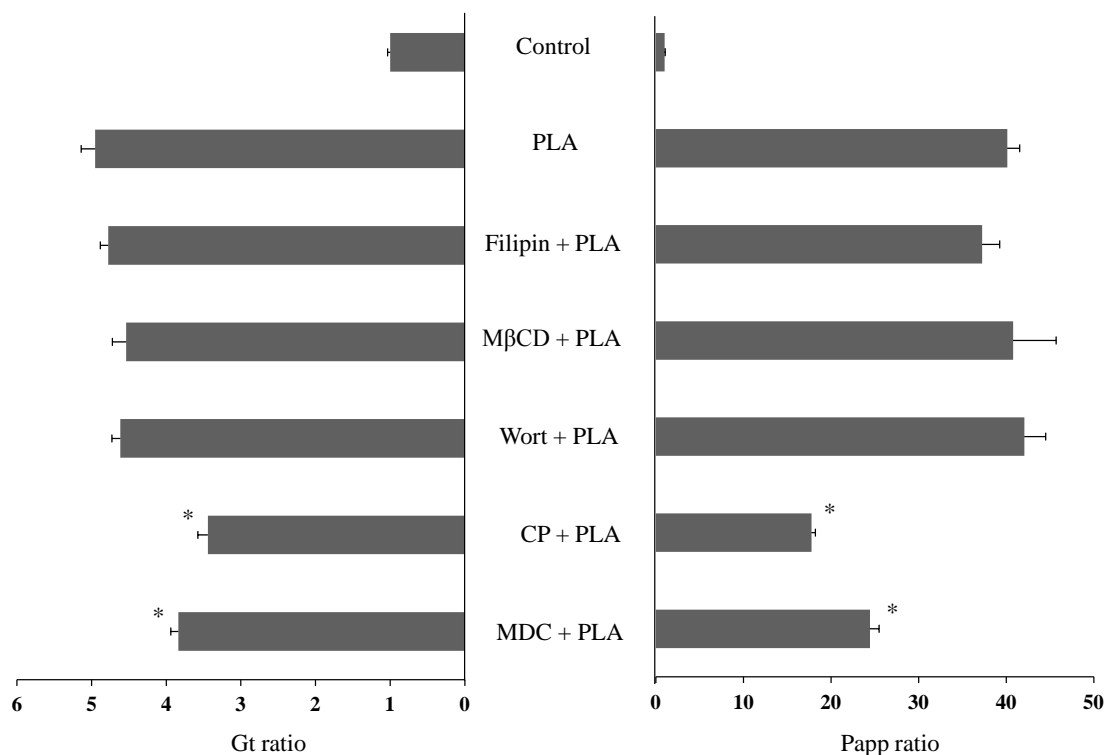
各群間の差を Dunnett の多重比較検定で解析し、 $p < 0.05$  を有意とみなした。

### 第3節 結果

#### 3-3-1 エンドサイトーシス阻害剤存在下の Caco-2 細胞 sheet における TEER 及び FD-4 透過性に対する PLA の影響

Figure 14 にカベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤である filipin 及び M $\beta$ CD、マクロピノサイトーシス阻害剤である Wort 及びクラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤である CP 及び MDC 存在下での Caco-2 細胞の膜コンダクタンス (Gt) 及び FD-4 の Papp に対する PLA の影響を示す。Gt 及び Papp は 100  $\mu$ g/mL PLA の適用により、コントロールと比較していずれも著しく増大した。PLA による Gt 及び Papp の増大は、filipin 及び M $\beta$ CD の存在下でもみられ、PLA 単独で適用したときと比較して有意な差は認められなかった。同様な結果が、Wort 存在下の Caco-2 細胞でもみられた。これに対し、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤である CP 及び MDC の適用では、PLA による Gt 及び Papp の増大を有意に抑制した ( $p < 0.05$ )。この抑制率は Gt でおよそ 80%程度であり、Papp に関しては半分程度にまで抑制された。

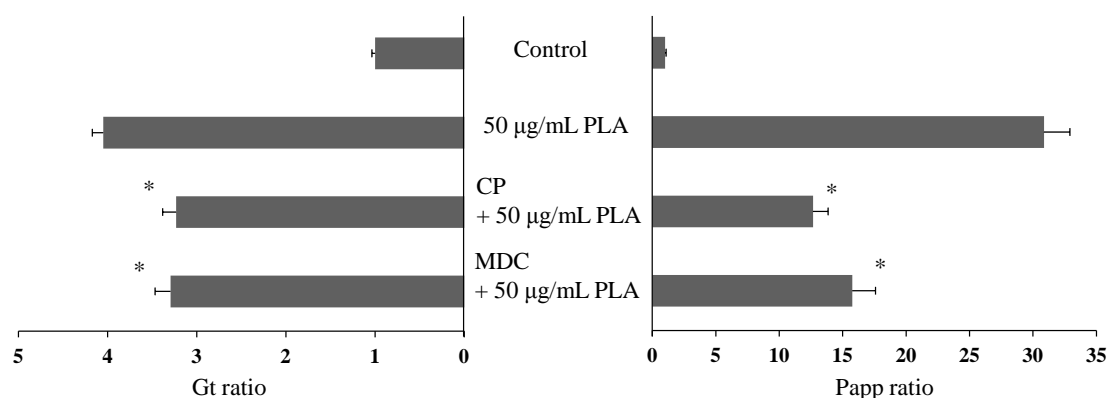
Figure 15 にはクラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤 CP 及び MDC 存在下で、50  $\mu$ g/mL PLA を適用したときの Gt 及び Papp に対する効果を示す。この濃度の PLA においても、CP 及び MDC は Gt 及び Papp の増大を有意に抑制した ( $p < 0.05$ )。しかし、PLA の適用濃度の違いによる CP 及び MDC の抑制率に差はほとんどなかった。



**Fig. 14 Effect of 100 µg/mL PLA on membrane conductance and FD-4 permeation in the presence of endocytosis inhibitors in Caco-2 cell monolayers.**

Caveolae-mediated endocytosis inhibitors, filipin and MβCD. Macropinocytosis inhibitor, Wrot. Clathrin-mediated endocytosis inhibitors, CP and MDC.

Each data represents mean ± S.E. (n = 4). \* $p < 0.05$  vs. PLA



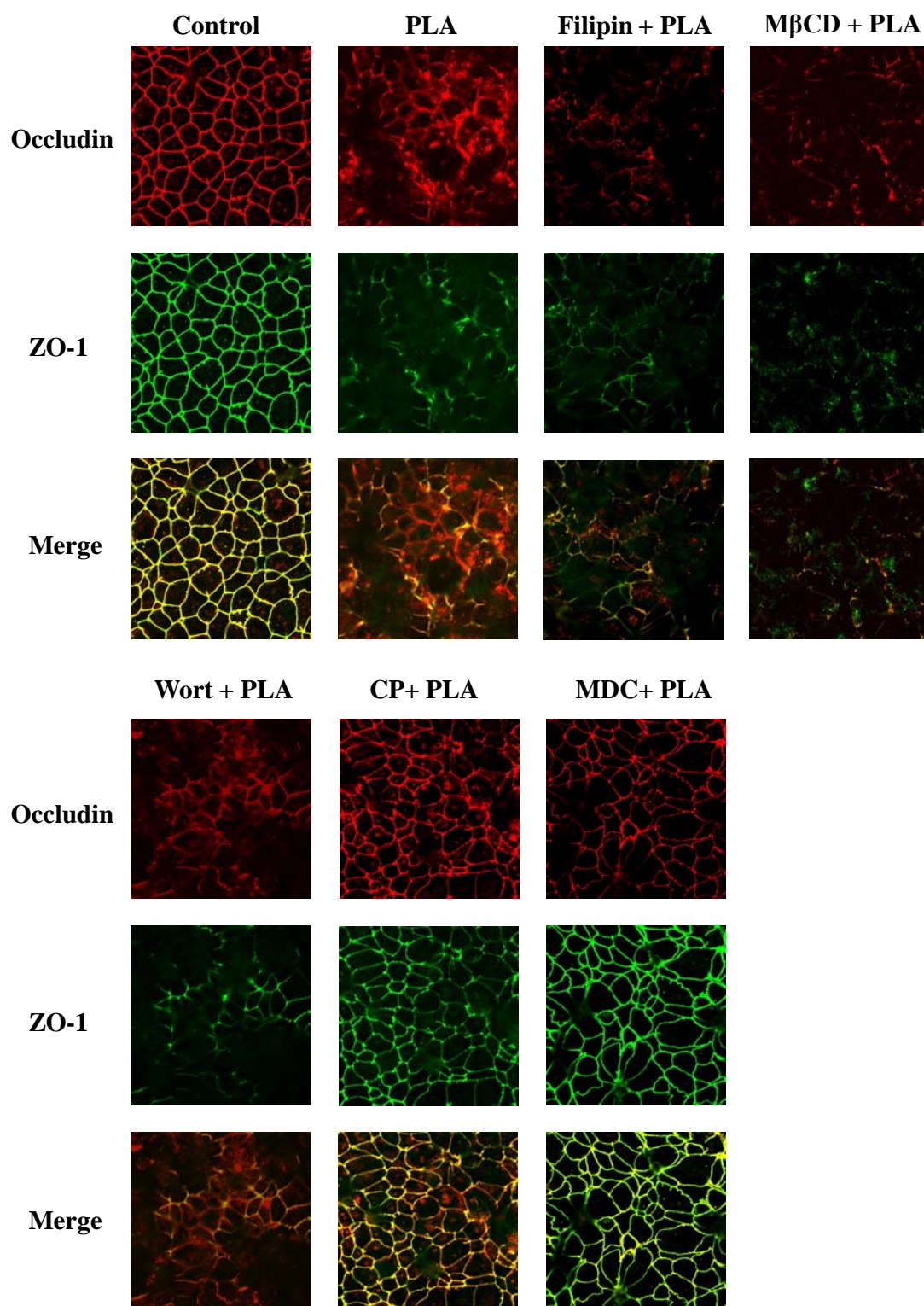
**Fig. 15 Effect of 50 µg/mL PLA on membrane conductance and FD-4 permeation in the presence of clathrin-mediated endocytosis inhibitors in Caco-2 cell monolayers.**

Each data represents mean ± S.E. (n = 4). \* $p < 0.05$  vs. PLA

### 3-3-2 エンドサイトーシス阻害剤存在下の Caco-2 細胞 sheet の TJ 関連タンパク質の局在性に対する PLA の影響

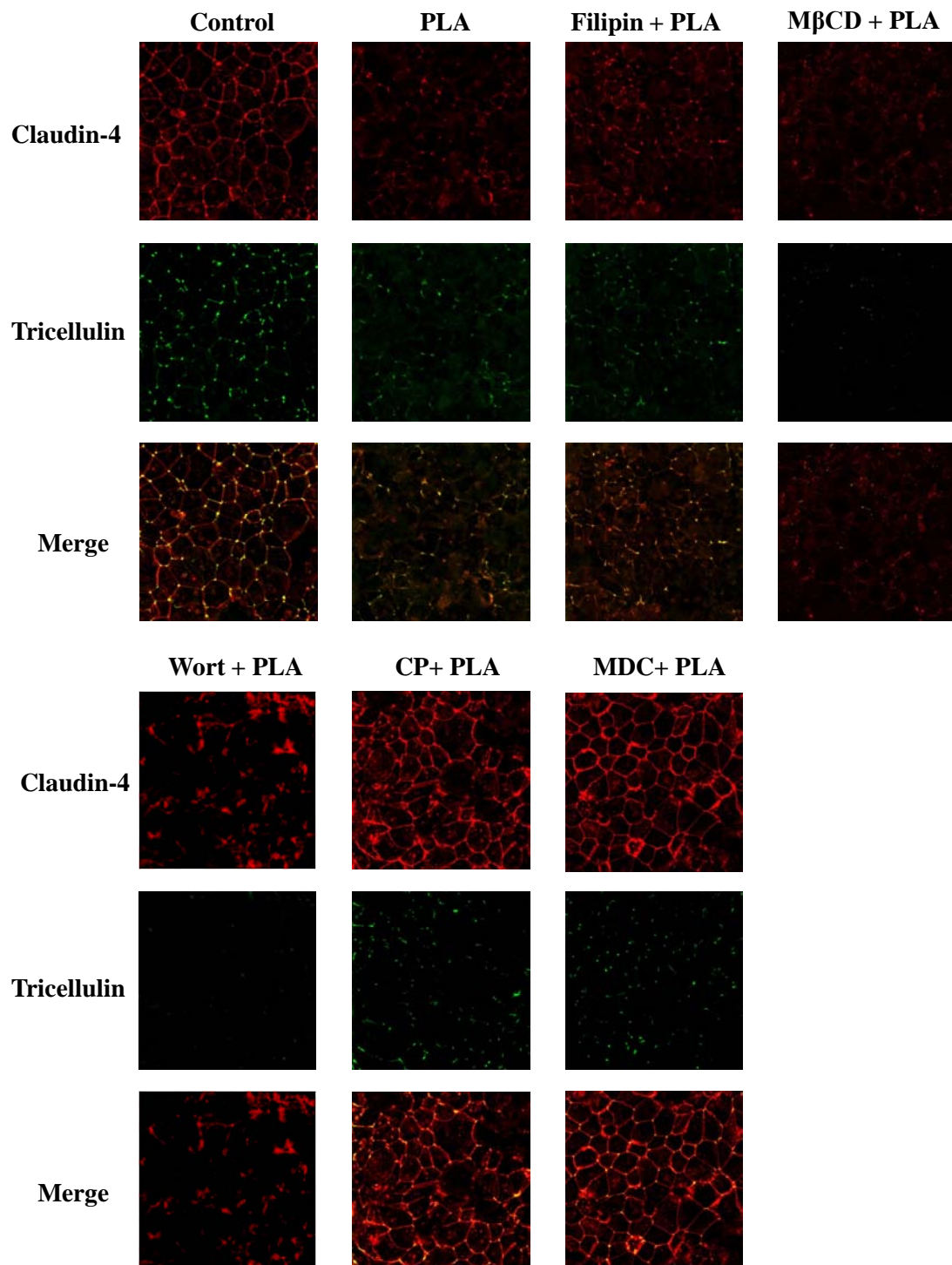
Figures 16 及び 17 に filipin, M $\beta$ CD, Wort, CP 及び MDC 存在下での Caco-2 細胞 sheet の TJ 関連タンパク質 occludin, ZO-1, claudin-4 及び tricellulin の局在性に対する PLA の影響を、Fig. 18 にそれらの画像の解析結果を示す。コントロールにおいて、occludin, ZO-1 及び claudin-4 は 2 細胞間に局在し、tricellulin は 3 細胞間に局在していたが、100  $\mu$ g/mL PLA の適用によりこれらのタンパク質はその部位から消失した。PLA によるこれら TJ 関連タンパク質の消失はカベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤である filipin 及び M $\beta$ CD、マクロピノサイトーシス阻害剤である Wort を用いても抑制されなかった。一方、クラスリン介在性エンドサイトーシスの阻害剤である CP 及び MDC 存在下では、occludin, ZO-1, claudin-4 及び tricellulin のいずれのタンパク質の消失も抑制された。これらの抑制はコントロールの 73~88%程度であった。



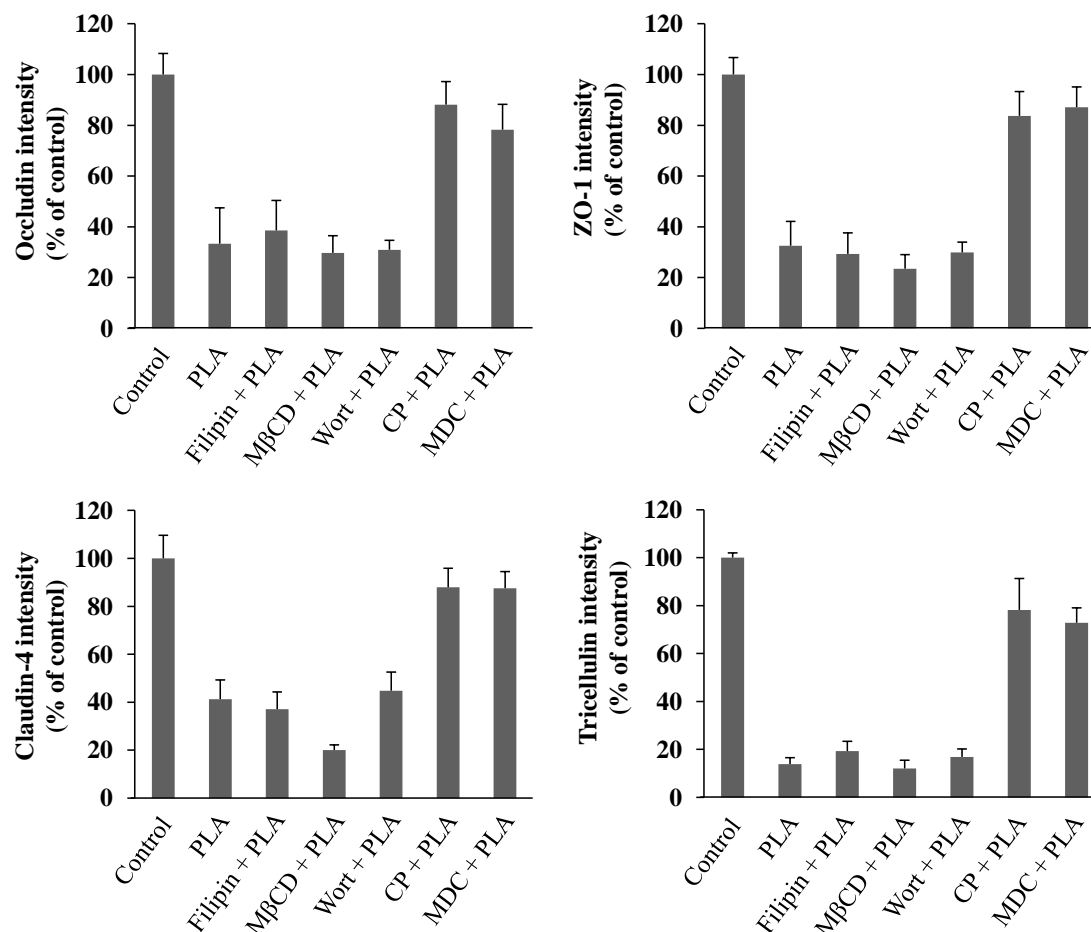


**Fig. 16** Effect of PLA on distribution of occludin and ZO-1 120 min after treatment with PLA in the presence of endocytosis inhibitors in Caco-2 cell sheet.

Caveolae-mediated endocytosis inhibitors, filipin and M $\beta$ CD. Macropinocytosis inhibitor, Wort. Clathrin-mediated endocytosis inhibitors, CP and MDC.



**Fig. 17** Effect of PLA on distribution of claudin-4 and tricellulin 120 min after treatment with PLA in the presence of endocytosis inhibitors in Caco-2 cell sheet. Caveolae-mediated endocytosis inhibitors, filipin and M $\beta$ CD. Macropinocytosis inhibitor, Wort. Clathrin-mediated endocytosis inhibitors, CP and MDC.



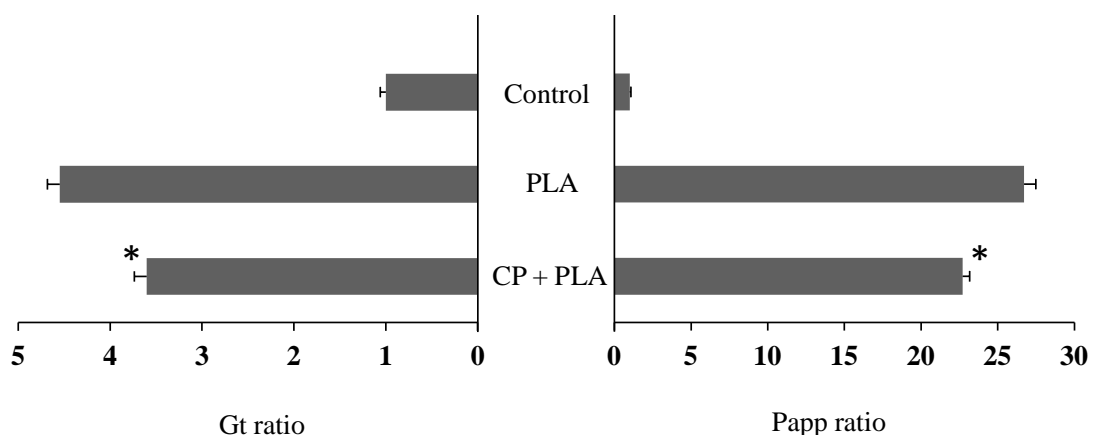
**Fig. 18** Change in tight junction protein levels after treatment with PLA in the presence of endocytosis inhibitor in Caco-2 cell monolayers.

Caveolae-mediated endocytosis inhibitors, filipin and MβCD. Macropinocytosis inhibitor, Wrot. Clathrin-mediated endocytosis inhibitors, CP and MDC.

Each data represents mean  $\pm$  S.E. (n = 4).

### 3-3-3 クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤存在下の Caco-2 細胞 sheet における erythritol 透過性に対する PLA の影響

クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤の適用で TJ 関連タンパク質の消失は著しく抑制されたが、FD-4 の Papp は半分程度の抑制であり、また、Gt に関しては 20%程度しか抑制されなかった。これらの結果は、エンドサイトーシス阻害剤の適用で TJ 部に関連タンパク質が残っているものの、TJ strand 構造に変化が生じている可能性を推察させる。もし、この仮説が正しければ、TEER を決定しているイオンや、さらには低分子薬物の透過は高分子の FD-4 に比べて容易であると考えられる。そこで、細胞間隙経路を主に透過すると考えられる水溶性低分子薬物である erythritol を用いて CP 存在下において透過実験を行った<sup>47)</sup>。その結果を Fig. 19 に示す。Erythritol の Papp は、コントロールと比較して PLA の適用により著しく増大した。クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤 CP 存在下で PLA を適用した場合、PLA 単独適用と比較して erythritol の Papp を有意に減少させたが、その減少率は control のおよそ 85%程度であった。また、Gt の減量率はおおよそ 83%であった。このように Papp と Gt の減少率は一致した。

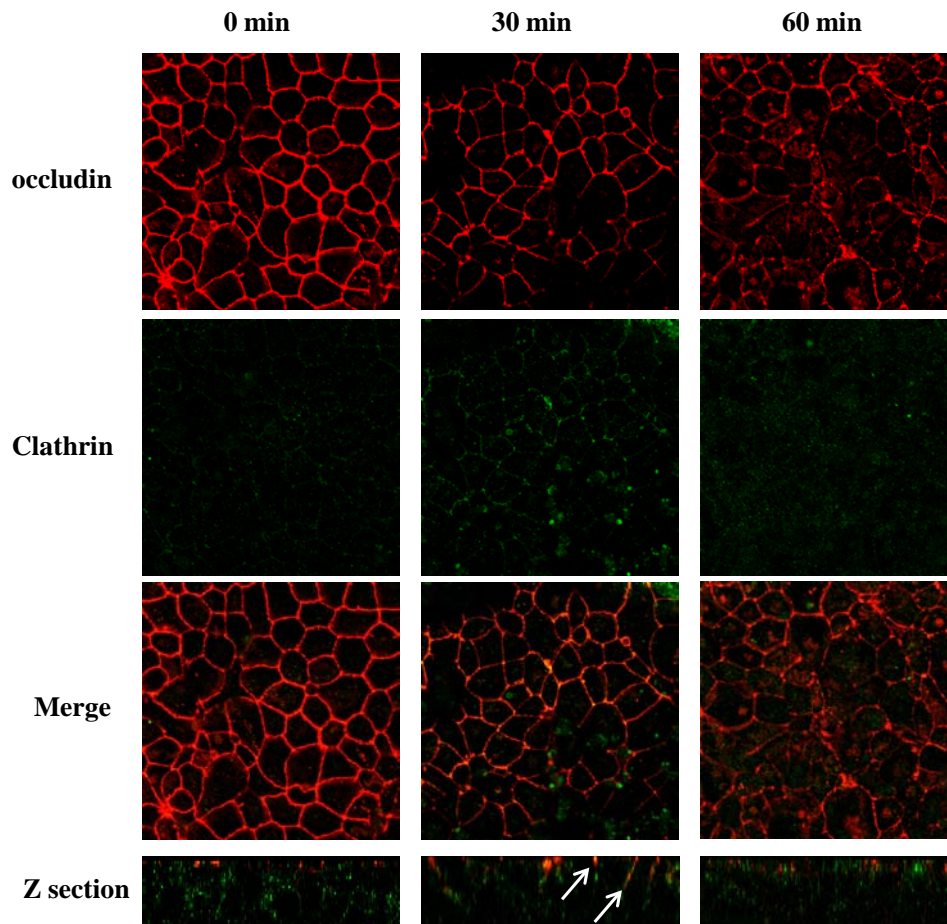


**Fig. 19 Effect of PLA on erythritol permeation in the presence of clathrin-mediated endocytosis inhibitor in Caco-2 cell monolayers.**

Each data represents mean  $\pm$  S.E. (n = 4) \* $p$ <0.05 vs. Control.  $^{\dagger}$  $p$ <0.05 vs. PLA

### 3-3-4 PLA 適用後における occludin の細胞内局在の同定

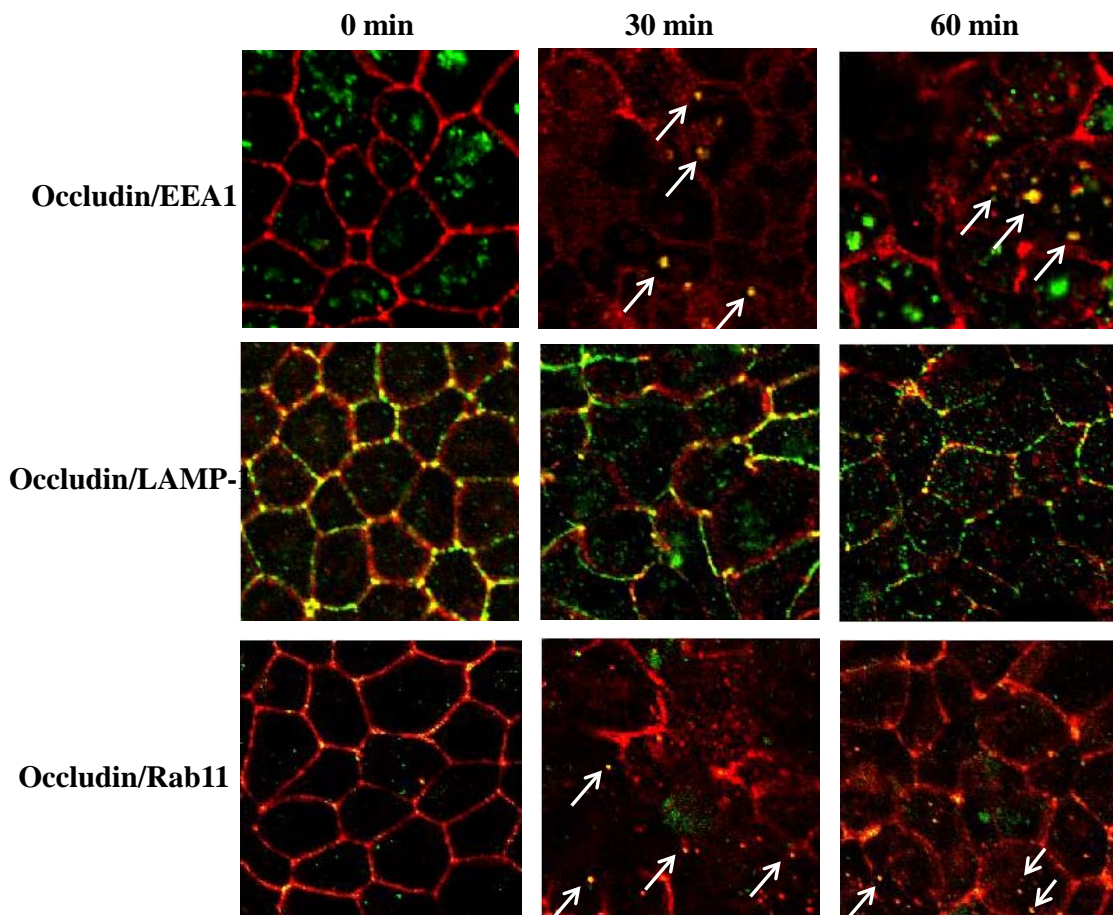
Figure 20 に Caco-2 細胞に 100  $\mu\text{g/mL}$  PLA 適用後の TJ 関連タンパク質 occludin 及びクラスリン介在性エンドサイトーシスに重要なタンパク質 clathrin の免疫染色画像を示す。コントロールにおいて、occludin は細胞間隙に局在し、clathrin は観察されなかった。PLA 適用 30 分後において、occludin は細胞間隙から消失しており、clathrin は細胞間隙部位に観察された。さらに矢印で示すように、occludin と clathrin は共局在していた。一方、PLA 適用 60 分後においては、occludin は細胞間隙から消失し、clathrin は認められなかった。



**Fig. 20** Time-dependent alteration in distribution of clathrin and occludin after treatment with PLA in Caco-2 cell monolayers.



Figure 21 に Caco-2 細胞に 100  $\mu\text{g/mL}$  PLA 適用後の occludin 及び初期エンドソームマーカータンパク質 EEA1、後期エンドソームマーカータンパク質 LAMP-1 及びリサイクリングエンドソームマーカータンパク質 Rab11 を免疫染色した結果を示す。コントロールにおいて、EEA1, LAMP-1 及び Rab11 は occludin と共局在を示さなかった。PLA 適用 30 分及び 60 分後の Caco-2 細胞内において、occludin は矢印で示すように EEA1 及び Rab11 と共局在していた。一方、LAMP-1 は PLA 適用 30 分及び 60 分後のいずれにおいても細胞内で occludin と共局在しなかった。



**Fig. 21** Colocalization with endosome marker proteins and occludin after treatment with PLA in Caco-2 cell monolayers.

## 第4節 小括

本章では、エンドサイトーシス阻害剤を用いて PLA による TJ 関連タンパク質の消失機構を検討し、更に occludin の細胞内動態についても調査した。その結果、コントロールと比較して、PLA 適用により増大した Gt 及び FD-4 の Papp は、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤を加えることにより、有意に抑制された ( $p < 0.05$ )。一方、カベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤及びマクロピノサイトーシス阻害剤を加えても Gt 及び Papp のいずれも PLA 単独適用と比較して有意な抑制は認められなかった。これらの結果と一致するように、TJ 関連タンパク質の局在性に関しても、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤存在下でのみ、これらのタンパク質の細胞間隙からの消失を抑制した。加えて、occludin と clathrin を共に免疫染色すると、これらタンパク質は共局在していた。従って、PLA による細胞間隙経路の開口には、TJ 関連タンパク質の細胞内への内在化が関与しており、それにはクラスリン介在性エンドサイトーシスが重要な役割を果たしていることが示唆された。

しかし、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤を適用したとき、PLA を適用しても TJ 関連タンパク質は細胞間隙部に局在していたが、FD-4 の Papp は半分程度の抑制、Gt に関してはわずかにしか抑制しなかった。この理由として、細胞間隙部に TJ 関連タンパク質は局在しているが、TJ 関連タンパク質間の相互作用が部分的に消失し、TJ strand 構造に変化が起こっていると推察された。よって、イオンや低分子薬物の透過では高分子の FD-4 よりも透過しやすいと考えられた。そこで、低分子薬物である erythritol を用いて同様に透過実験を行った。その結果、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤を加えたときの erythritol の Papp は PLA のみを適用したときと比較して 85%程度に抑制され、Gt は 83%であった。従って、Gt と erythritol の Papp の抑制の程度がほぼ同等で

あったことから、細胞間隙部位はイオンや低分子薬物が十分に透過できる程度開口していることが示唆された。そのため、Gt はクラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤を用いてもあまり抑制されなかったと推察された。

さらに、occludin の細胞内での局在部位を詳細に検討した結果、occludin は初期エンドソームのマーカーである EEA1 及びリサイクリングエンドソームのマーカータンパク質である Rab11 と共局在していた。これらの結果は、PLA により内在化された occludin は初期エンドソームへ輸送され、その後にリサイクリングエンドソームへ移行し、再び細胞間隙部に戻り、再利用されることを示唆している。また、今回検討しなかった他の TJ 関連タンパク質 ZO-1, claudin-4 及び tricellulin においても PLA の適用により分解されずに細胞内に存在していることが考えられるために、これらのタンパク質も同様なエンドソーム経路を介して、細胞膜に戻る可能性が推察された。



### 第3編 PLAにより引き起こされる Caco-2細胞内のリン酸化タンパク質の同定並びに機能解析

#### 第1節 小緒言

TJは細胞-細胞間を密着させる重要な構造であり、細胞間隙部位からの物質の拡散を制限するバリアー機能に加え、apical side と basolateral side の膜タンパク質の容易な拡散を防ぐフェンス機能、細胞内シグナル伝達の足場としての機能を備えている<sup>50-53)</sup>。このように TJ は多様な機能を有しており、その制御に関しては複雑で、明らかにされていないことも多い。

これまでに、TJ の形成及びその維持には、cAMP, PKG, G-protein, phospholipase C 及び diacylglycerol 等の様々なシグナル分子が関与していると報告されている<sup>54-58)</sup>。更に、TJ を形成する occludin, ZO-1, claudins 及び tricellulin は phosphoproteins として特徴づけられており<sup>59-63)</sup>、上記のシグナル分子に加えて、細胞内 serine/threonine kinase<sup>64, 65)</sup>, tyrosine kinase<sup>64, 65)</sup>, mitogen activated protein kinase (MAPK)<sup>66, 67)</sup>, 及び phosphatidylinositol 3-kinase<sup>68)</sup>, Rho kinase<sup>69)</sup> によって、これらの TJ 関連タンパク質がリン酸化されたり、細胞内 serine/threonine phosphatase<sup>70)</sup> や tyrosine phosphatase<sup>71)</sup> で脱リン酸化されることにより、その細胞内での局在が変化することが知られている。

吸収促進剤による細胞間隙経路の開口メカニズムは詳細には明らかにされていないが、ポリカチオン系の吸収促進剤である chitosan は integrin 受容体を介して、kinase である Src 及び focal adhesion kinase (FAK) を活性化させることにより TJ の開口を導くことが報告されている<sup>36)</sup>。一方、PLA は、細胞内 serine/threonine kinase 及び tyrosine phosphatase を活性化することにより、ZO-1 のリン酸化及び

occludin の脱リン酸化を引き起こし、それらのタンパク質の細胞内での局在を変化させると報告されている<sup>16)</sup>。

このように、同じポリカチオン系の吸収促進剤でも細胞間隙経路の開ロメカニズムは異なることが予想されるが、タンパク質のリン酸化や脱リン酸化が細胞間隙経路の開ロや TJ の再形成に深く関与していると考えられる。そこで本編では、PLA 適用後にリン酸化される細胞内タンパク質を抗体アレイ法を用いて網羅的に同定し、(1) それらリン酸化タンパク質が細胞間隙経路の開ロに関わっているのか、(2) 開ロ後の再形成に関わっているのか、の観点から調べた。

## 第2節 実験方法

### 4-2-1 試薬及び抗体

Poly-L-arginine (MW 44,300), fluorescein-isothiocyanate dextran (FD-4, MW 3,850), SB239063, FR180204 を Sigma Aldrich から購入した。Human Phospho-Kinase Array kit を R&D system (MN, U.S.A) から購入した。Mouse anti ERK 1/2 (phosphor T185 + Y187 + T202 + Y204) を Abcam (Cambridge, U.K.) から購入した。Rabbit anti ERK 1/2 pan antibody を Invitrogen (Carlsbad, CA) から購入した。HRP-conjugated goat anti mouse IgG 及び HRP-conjugated goat anti rabbit IgG を Santa Cruz Biotechnology (Santa cruz, CA) より購入した。

### 4-2-2 細胞培養

2-2-2 と同様の方法で調製した。

### 4-2-3 抗体アレイ法

Transwell にて Caco-2 細胞を 21-28 日間培養した後、TJ を形成した細胞 sheet を HBSS 溶液で 2 回洗浄し、HBSS 溶液を Transwell の apical side に 1.5 mL、basal side に 2.6 mL 加え、37°C で 60 分間インキュベートした。インキュベーション後、50 µg/mL PLA を 30 及び 120 分、100 µg/mL PLA を 120 分間、細胞の apical side に適用した。その後、抗体アレイキットに付属の buffer を用いて細胞ライセートを調製し、BCA protein assay を用いてタンパク質量を補正した。細胞ライセートを抗体が結合している membrane と一晩反応させた。抗体反応後、membrane を kit 付属の wash buffer を用いて 3 回洗浄した。その後、kit 付属の 2 次抗体 buffer を加えて 1 時間インキュベートし、wash buffer を用いて membrane を 3 回洗浄した。洗浄後、Super Signal West Dura を membrane に塗布し、化学発光を LAS-1000 により検出した。検出したシグナルを、

Image J software を用いて画像解析した。

#### 4-2-4 MAPK 阻害剤の調製

ERK1/2 阻害剤 FR180204 及び p38 阻害剤 SB239063 を DMSO を用いて溶解し、それぞれ 50 mM のストック溶液を調製した。実験直前に HBSS を用いて目的とする濃度に希釈し、実験に供した。Table 5 に実験に用いた各阻害剤の濃度を示す。

Table 5 MAPK inhibitors and effect.

Inhibitors	Concentrations	Inhibition of MAPK pathway
FR180204	20 or 50 $\mu$ M	ERK pathway
SB239063	10 or 50 $\mu$ M	p38 pathway

#### 4-2-5 TEER 測定並びに FD-4 透過実験

Transwell にて 21-28 日間培養し、TJ を形成した Caco-2 細胞単 sheet を、HBSS 溶液にて 2 回洗浄した。洗浄後、Transwell の apical side に 1.5 mL、basal side に 2.6 mL の MAPK 阻害剤を含む HBSS 溶液を加え、37°C で 60 分間インキュベートした。インキュベーション後に TEER を測定し、初期 TEER とした。Apical side に 100  $\mu$ g/mL PLA と 2.5 mg/mL FD-4 を適用後、0, 15, 30, 45, 60, 90 及び 120 分に TEER の測定並びに basal side の溶液を 0.2 mL サンプルングし、その後直ちに同様の MAPK 阻害剤を含む fresh な HBSS 溶液を同量添加した。TEER の測定は、2-2-3 と同様な方法で行い、Gt を算出した。FD-4 の蛍光強度を 2-2-4 と同様の方法で測定し、得られた累積透過挙動から FD-4 の Papp を算出した。

#### 4-2-6 Recovery 試験

Transwell にて Caco-2 細胞を 21-28 日間培養した後、TJ を形成した細胞 sheet を HBSS 溶液で 2 回洗浄した。その後、HBSS 溶液又は MAPK 阻害剤溶液を Transwell の apical side に 1.5 mL、basal side に 2.6 mL 加え、37°C で 60 分間インキュベートした。インキュベーション後、TEER を測定し、初期の TEER 値とした。初期 TEER を測定した後、apical side に 50 µg/mL PLA を 120 分間適用し、TEER を測定した。その後、apical side 及び basal side を HBSS 溶液で 2 回洗浄した後、通常の培地または MAPK 阻害剤を希釈した培地に置き換えた。24 時間及び 48 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内でインキュベートし、その時点での TEER を測定した。

#### 4-2-7 Immunoblot analysis

Caco-2 細胞 sheet を HBSS 溶液にて 2 回洗浄した後、HBSS 溶液を Transwell の apical side に 1.5 mL、basal side に 2.6 mL を加え、37°C で 60 分間インキュベートした。インキュベーション後、apical side に 50 µg/mL PLA を適用し、0, 30, 60 及び 120 分間インキュベートした。インキュベーション後、HBSS 溶液で洗浄し、SDS buffer を加えて細胞ライセートを調製した。その後、2-2-8 と同様の方法で、得られたライセートのタンパク質濃度を補正し、電気泳動及び Westernblot を行った。転写後の PVDF 膜を 3% スキムミルクを含む PBS-T で 1 時間インキュベートし、洗浄後、一次抗体である phospho ERK1/2 (dilution, 1:1000) 及び ERK1/2 (dilution, 1:1000) を用いて、4°C で一晩インキュベートした。PVDF 膜を PBS-T で 15 分間洗浄し、これを 3 回行った。洗浄後、これらの一次抗体に対する HRP-conjugated 二次抗体 (dilution, 1:1000) で 1 時間インキュベートした。PVDF 膜を再び PBS-T で 15 分間洗浄し、これを 3 回行った。洗浄後、PVDF 膜に Super

Signal West Dura を塗布し、化学発光を LAS-1000 を用いて検出した。Phospho ERK1/2 及び ERK1/2 のバンド強度を Image J software program を用いて定量し、ERK1/2 のバンド強度を用いて補正を行った。

また、PLA の除去による TEER の変化と、ERK 1/2 のリン酸化レベルの関係を調べるため、PLA を除去してから 24 時間及び 48 時間後の細胞を回収し、上記と同様の方法で ERK 1/2 のリン酸化レベルを評価した。

#### **4-2-8 統計解析**

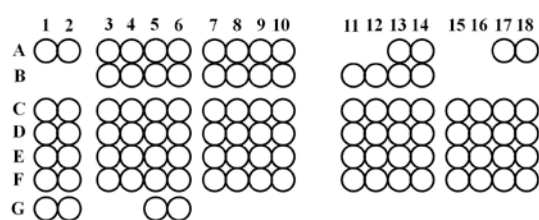
各群間の差を Dunnett の多重比較検定で解析し、 $p < 0.05$  を有意とみなした。

## 第3節 結果

### 4-3-1 PLA 適用による各種タンパク質のリン酸化レベルの解析

PLA による細胞間隙経路の透過性の増大には、細胞内伝達シグナルとしてリン酸化及び脱リン酸化反応が関与している可能性がある。そこで、Caco-2 細胞に PLA を適用し、細胞内でリン酸化を受けるタンパク質を、抗体アレイ法を用いて同定した。

Figure 22 及び Table 6 に今回検討したタンパク質を、Fig. 23 に各種条件下の抗体アレイの結果と顕著に変化が認められたタンパク質の強度を解析した結果を示す。50 µg/mL PLA 適用 30 分後において、MAPK である ERK 1/2 の強いリン酸化のシグナルが認められた。また、p38 MAPK, MSK1/2 及び cAMP response element binding (CREB) においてもリン酸化が認められた。PLA 適用 120 分後においては、30 分間適用したときと同様に ERK 1/2 の強いリン酸化のシグナルが認められた。また、MSK1/2 及び CREB でもリン酸化のシグナルが認められたが、30 分間適用したときに認められた p38 MAPK のリン酸化のシグナルは、適用 120 分後には消失していた。さらに、100 µg/mL PLA を 120 分間適用したときでも、ERK1/2, MSK1/2 及び CREB のリン酸化が認められた。また、50 µg/mL PLA を適用したときには認められなかった JNK のリン酸化が認められた。興味深いことに、TJ の制御において重要なキナーゼである Yes, Src 及び FAK のリン酸化は認められなかった。

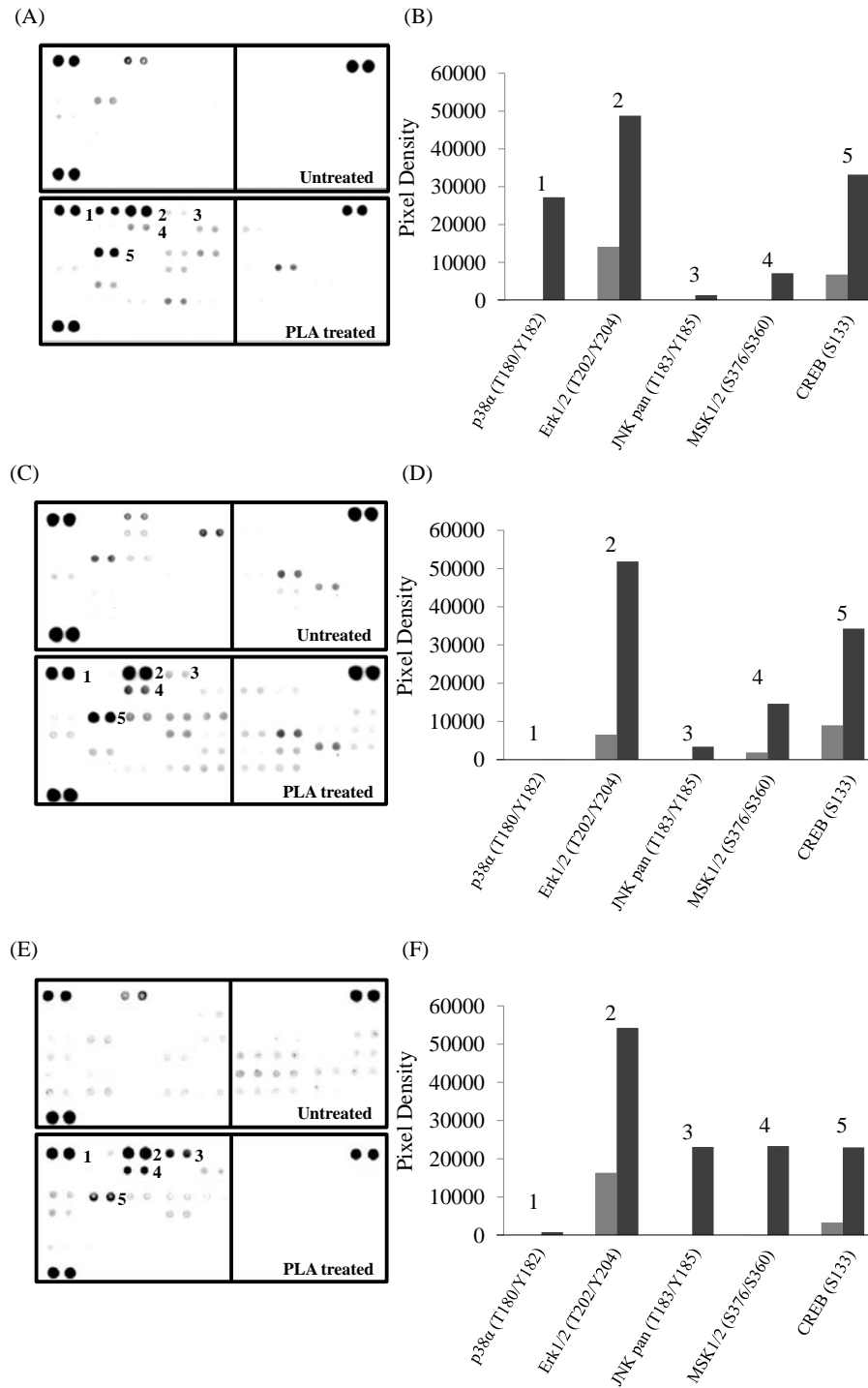


**Fig. 22 The human phospho-kinase array coordinates.**

**Table 6 The human phospho-kinase array coordinates.**

Spot	Target/Control	Phosphorylation Site	Spot	Target/Control	Phosphorylation Site
A-A1, A2	Reference Spot	-	A-D7, D8	STAT2	Y689
A-A3, A4	p38 $\alpha$	T180/Y182	A-D9, D10	STAT5a	Y694
A-A5, A6	ERK1/2	T202/Y204, T185/Y187	B-D11, D12	p70 S6 Kinase	T421/S424
A-A7, A8	JNK pan	T183/Y185, T221/Y223	B-D17, D18	PLC $\gamma$ -1	Y783
A-A9, A10	GSK-3 $\alpha/\beta$	S21/S9	A-E1, E2	Fyn	Y420
B-A13, A14	p53	S392	A-E3, E4	Yes	Y426
B-A17, A18	Reference Spot	-	A-E5, E6	Fgr	Y412
A-B3, B4	MEK1/2	S218/S222, S222/S226	A-E7, E8	STAT3	Y705
A-B5, B6	MSK1/2	S376/S360	A-E9, E10	STAT5b	Y699
A-B7, B8	AMPK $\alpha$ 1	T174	B-E11, E12	p70 S6 Kinase	T229
A-B9, B10	Akt	S473	B-E13, E14	RSK1/2	S221/S227
B-B11, B12	Akt	T308	B-E15, E16	c-Jun	S63
B-B13, B14	p53	S46	B-E17, E18	Pyk2	Y402
A-C1, C2	TOR	S2448	A-F1, F2	Hck	Y411
A-C3, C4	CREB	S133	A-F3, F4	Chk-2	T68
A-C5, C6	HSP27	S78/S82	A-F5, F6	FAK	Y397
A-C7, C8	AMPK $\alpha$ 2	T172	A-F7, F8	STAT6	Y641
A-C9, C10	$\beta$ -Catenin	-	A-F9, F10	STAT5a/b	Y694/Y699
B-C11, C12	p70 S6 Kinase	T389	B-F11, F12	STAT1	Y701
B-C13, C14	p53	S15	B-F13, F14	STAT4	Y693
B-C15, C16	p27	T198	B-F15, F16	eNOS	S1177
B-C17, C18	Paxillin	Y118	B-F17, F18	Negative Control	-
A-D1, D2	Src	Y419	A-G1, G2	Reference Spot	-
A-D3, D4	Lyn	Y397	A-G5, G6	Negative Control	-
A-D5, D6	Lck	Y394			





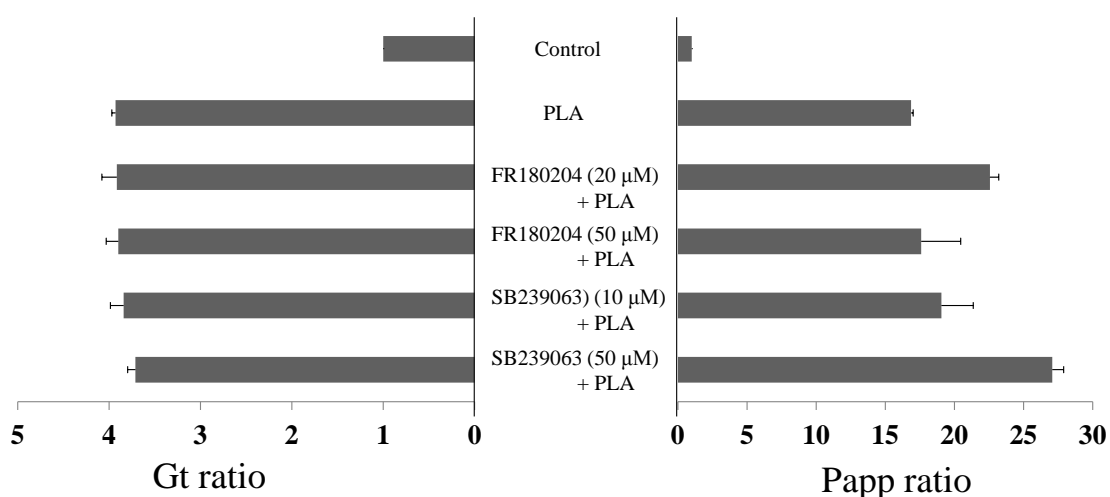
**Fig. 23** Change in phosphorylation of antibody array after treatment with PLA in Caco-2 cell monolayers.

An antibody array were each treatment with cell lysate by 50  $\mu\text{g/mL}$  PLA for 30 min (A), 50  $\mu\text{g/mL}$  PLA for 120 min (C), 100  $\mu\text{g/mL}$  PLA for 120 min (E), and the pixcell density of the phosphoprotein spots was also analyzed (B, D and F).

#### 4-3-2 PLA による水溶性高分子薬物の透過促進効果に対する MAPK 阻害剤の影響

PLA 適用によりリン酸化レベルの増大が認められたタンパク質は、PLA による透過促進において、何らかの役割を担っていることが考えられた。そこで、リン酸化が認められたタンパク質のうち、MAPK である p38 及び ERK 1/2 に着目し、それらのタンパク質のリン酸化阻害剤を用いて、PLA による透過促進効果に及ぼす MAPK 阻害剤の影響を検討した。

Figure 24 に各種 MAPK 阻害剤存在下における 50  $\mu\text{g/mL}$  PLA 適用後の Gt 及び FD-4 の Papp の比を示す。50  $\mu\text{g/mL}$  PLA のみの適用に比較して、ERK1/2 阻害剤である FR180204 を併用した場合、Gt 及び Papp の増大に対する抑制効果はみられなかった。また、同様に p38 $\alpha$  阻害剤である SB239063 を併用した場合においても、Gt 及び Papp の増大を抑制しなかった。

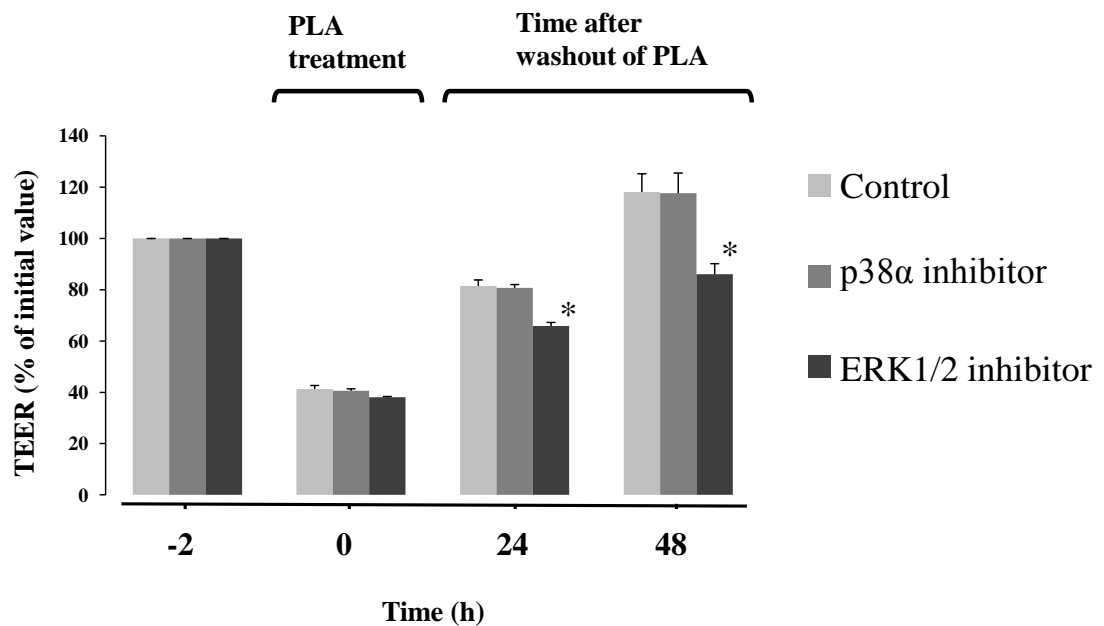


**Fig. 24 Effects of PLA on membrane conductance (Gt) and Papp of FD-4 in the presence of MAP kinase inhibitors in Caco-2 cell monolayers.**

FR180402 and SB239063 are ERK1/2 and p38 inhibitor, respectively.

#### 4-3-3 TJの再形成とMAPKの関連性

TJの再形成の評価は、TEERを指標とした。Figure 25にCaco-2細胞にPLAを2時間適用し、その後PLAを除去したときのTEERの変化を示す。PLAのみを適用したコントロール群では、PLA除去後24時間で初期TEER値の約80%までTEERは回復し、48時間後ではTEERは完全に回復した。p38阻害剤を処理したCaco-2細胞においても、コントロール群と同様の挙動を示した。一方、ERK1/2阻害剤を処理したCaco-2細胞では、PLA除去後24時間で初期TEER値の約65%まで、48時間で約85%までTEERは回復したが、初期値まで戻ることはなかった。これらの結果は、ERK1/2がTEERの回復過程において重要な役割を果たしていることを示唆している。

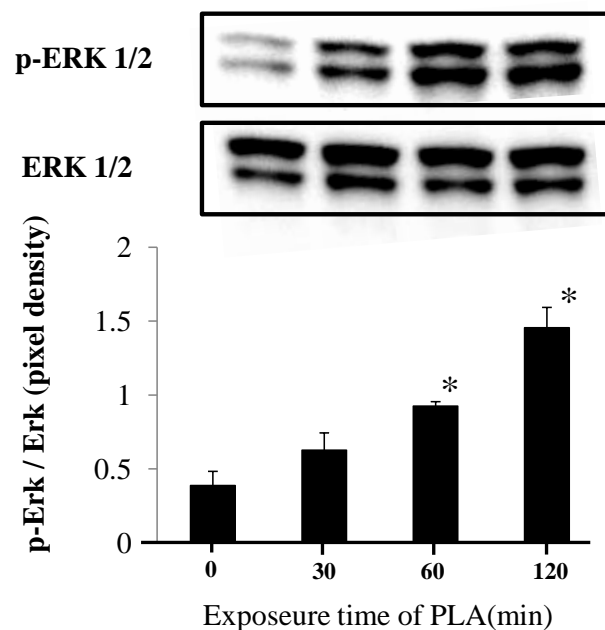


**Fig. 25 Recovery of TEER after removal of PLA in Caco-2 cell monolayers.**

FR180402 and SB239063 are ERK1/2 and p38 inhibitor, respectively.

Each data represents mean  $\pm$  S.E. ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$  vs. Control

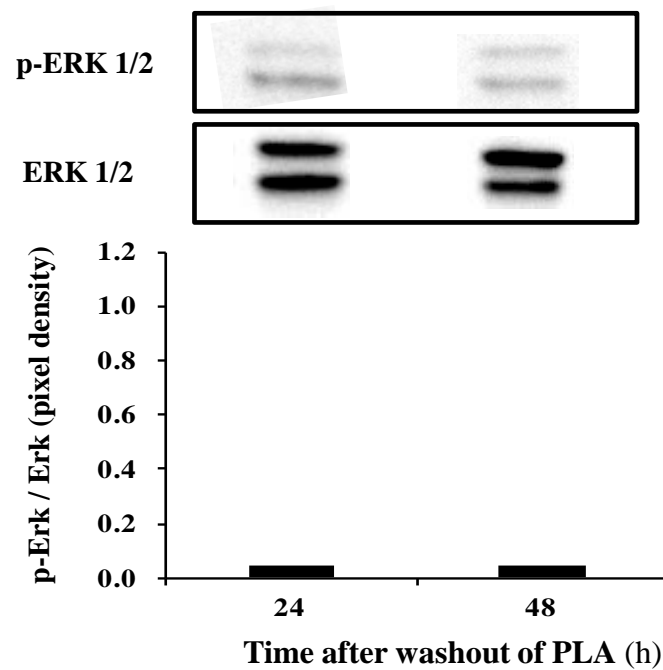
ERK1/2 が TJ 再形成において重要な役割を果たしていることが予想されたため、ERK1/2 のリン酸化の詳細な解析を行った。Fig. 26 に各 PLA 処理時間におけるリン酸化 ERK1/2 のバンド強度を示す。PLA 適用後の ERK 1/2 のリン酸化レベルは、適用時間が長くなると増大した。この ERK1/2 のリン酸化レベルの増大は PLA 適用 60 分以降で有意であった。



**Fig. 26 Time-dependent change in phosphorylation level of p-ERK1/2 after treatment with PLA in Caco-2 cell monolayers.**

Each data represents mean  $\pm$  S.E. (n = 4). \* $p$ <0.05 vs. Control

Figure 27 に PLA を Caco-2 細胞に 2 時間適用した後、PLA を除去し、24 時間及び 48 時間インキュベートしたときのリン酸化 ERK1/2 のバンド強度を示す。PLA 適用時に増大したリン酸化 ERK1/2 のバンド強度は、PLA 除去後 24 及び 48 時間において著しく低下した。



**Fig. 27 Time dependent changes in phosphorylation level of p-ERK1/2 24 and 48 h after removal of PLA in Caco-2 cell monolayers.**

Each data represents mean  $\pm$  S.E. (n = 4).

## 第4節 小括

本章では抗体アレイ法を用いて、PLA の適用によりリン酸化をうける細胞内タンパク質を同定し、さらに、同定されたタンパク質の阻害剤を用いて、PLA による細胞間隙の開口並びに TJ の再形成におけるこれらの影響を評価した。

抗体アレイ法を用いた検討から、PLA の適用により、MAPK である p38 $\alpha$ , ERK 1/2, JNK, MSK1/2 及び CREB のリン酸化レベルの増大を認めた。JNK に関しては 100  $\mu$ g/mL PLA の適用でのみリン酸化が認められたことから、PLA による細胞間隙の開口及び閉口には関与しないと推察された。MSK1/2 及び CREB は ERK1/2 の下流に位置するタンパク質であり、ERK1/2 のリン酸化に伴い、これらもリン酸化されたと考えられる。一方、p38 $\alpha$  は一過性のリン酸化を示した。p38 は細胞間隙の開口に関与することが報告されており<sup>72)</sup>、PLA の適用により TEER が著しく低下する時間においてのみ活性化しているのではないかと推察された。

そこでまず、ERK1/2 及び p38 $\alpha$  のリン酸化が PLA の透過促進効果に関与しているかどうかを調べた。しかしながら、これら MAPK の阻害剤を用いた透過実験では、PLA の透過促進効果を抑制しなかった。これらの結果は、p38 $\alpha$  及び ERK 1/2 のリン酸化レベルの増大が、PLA による細胞間隙透過性の増大に関与していないことを示唆している。

また、Yes, Src 及び FAK が細胞間隙経路の開口に関わっていることが報告されているが<sup>73, 74)</sup>、抗体アレイ法の結果ではこれらのタンパク質のリン酸化も認められず、PLA による細胞間隙経路の開口において Yes, Src 及び FAK は関与しないと考えられた。

次に、抗体アレイ法において持続的なリン酸化を認めた ERK 1/2 に着目し、そのリン酸化状態及び PLA の適用により開口した細胞間隙部位の TJ の

reassembly との関係を検討した。その結果、PLA 除去による TEER の recovery 試験において、ERK1/2 の阻害剤存在下ではコントロールに比べて TEER の回復が遅延した。従って、リン酸化した ERK1/2 が TJ の reassembly において重要な役割を果たしていることが示唆された。加えて、ERK1/2 のリン酸化レベルの変化を詳細に解析した結果、PLA 適用 30 分後にはリン酸化 ERK 1/2 のバンド強度が増加しており、少なくとも 120 分まで適用時間に依存して ERK 1/2 のリン酸化レベルは増大した。これらの結果は、PLA 適用により ERK 1/2 が持続的なリン酸化を受けるという抗体アレイ法の結果と一致した。また、PLA 除去 24 時間後には、リン酸化 ERK 1/2 のバンドはほとんど検出されなかった。これらの結果は、TJ の再形成過程において ERK 1/2 が密接に関係していることを示している。また、PLA の適用時間に依存したリン酸化 ERK1/2 レベルの増大は、PLA による TJ 破綻に対する生理的反応の結果と推察された。

## 結論

本研究では、鼻粘膜上皮で認められた PLA による水溶性高分子薬物の吸収促進効果とそのメカニズムに関して腸管上皮を用いてさらなる解析を行った。

これまでに、PLA が腸管粘膜においても水溶性高分子薬物の吸収性を改善させるかどうかはほとんど検討されておらず、まず初めに、*in vivo* ラット腸管各部位における PLA の吸収促進効果を評価した。次に、PLA による透過促進メカニズムを解析するために、機能解析が進んでいる大腸癌由来細胞 Caco-2 細胞の単層 (sheet) を用いて水溶性高分子薬物の主な透過経路である細胞間隙の TJ 関連タンパク質 occludin、ZO-1、claudin-4 及び tricellulin の局在性や発現量を評価した。さらに、TJ 関連タンパク質の細胞間隙からの消失機構を検討するとともに、PLA の適用により細胞内でリン酸化が認められるタンパク質を同定し、それらリン酸化タンパク質の役割について評価した結果、以下の結論を得た。

### 1. ラット腸管上皮における PLA による水溶性高分子薬物 FD-4 の吸収促進効果に関する検討

*In situ* closed loop 法を用いたラット腸管各部位 (十二指腸、空腸、回腸及び結腸) からの FD-4 の吸収は、PLA を併用することにより濃度依存的に、コントロールよりも増大した。しかし、PLA の吸収促進効果には部位差が認められた。この要因を調べた結果、十二指腸、空腸及び回腸では、粘液中のタンパク質分解酵素量の違いによる PLA の分解速度の違いが考えられた。結腸における違いは、主に吸収表面積の違いによると考えられ、部分的に TJ 関連タンパク質の occludin の発現量の違いの影響を示唆した。



## 2. Caco-2 細胞 sheet における水溶性高分子薬物の FD-4 の透過促進機構

Figure 28 に Caco-2 細胞に PLA を適用したときの水溶性高分子薬物の透過促進メカニズムを示す。PLA を適用すると、細胞内においてクラスリン介在性エンドサイトーシスが惹起される。このエンドサイトーシスは細胞間隙部の TJ 関連タンパク質を細胞内へ内在化させることにより、細胞間隙部の TJ 関連タンパク質の消失を引き起こす。その結果、細胞間隙経路の開口が導かれ、細胞間隙経路を介した FD-4 の透過が著しく増大したと考えられる。

また、occludin の内在化後の細胞内動態を検討した結果、これらは Fig. 28 で示すように、細胞内の初期エンドソームからリサイクリングエンドソームに分布した。PLA は TJ 関連タンパク質の ZO-1、claudin-4 及び tricellulin を分解させないので、これら TJ 関連タンパク質も occludin と同様の経路を介してリサイクリングエンドソームに分布することが推察される。

このように、これら TJ 関連タンパク質はリサイクリングエンドソームへ移行するので、PLA を除去した後、再利用されて TJ の再形成に利用されるものと考えられた。

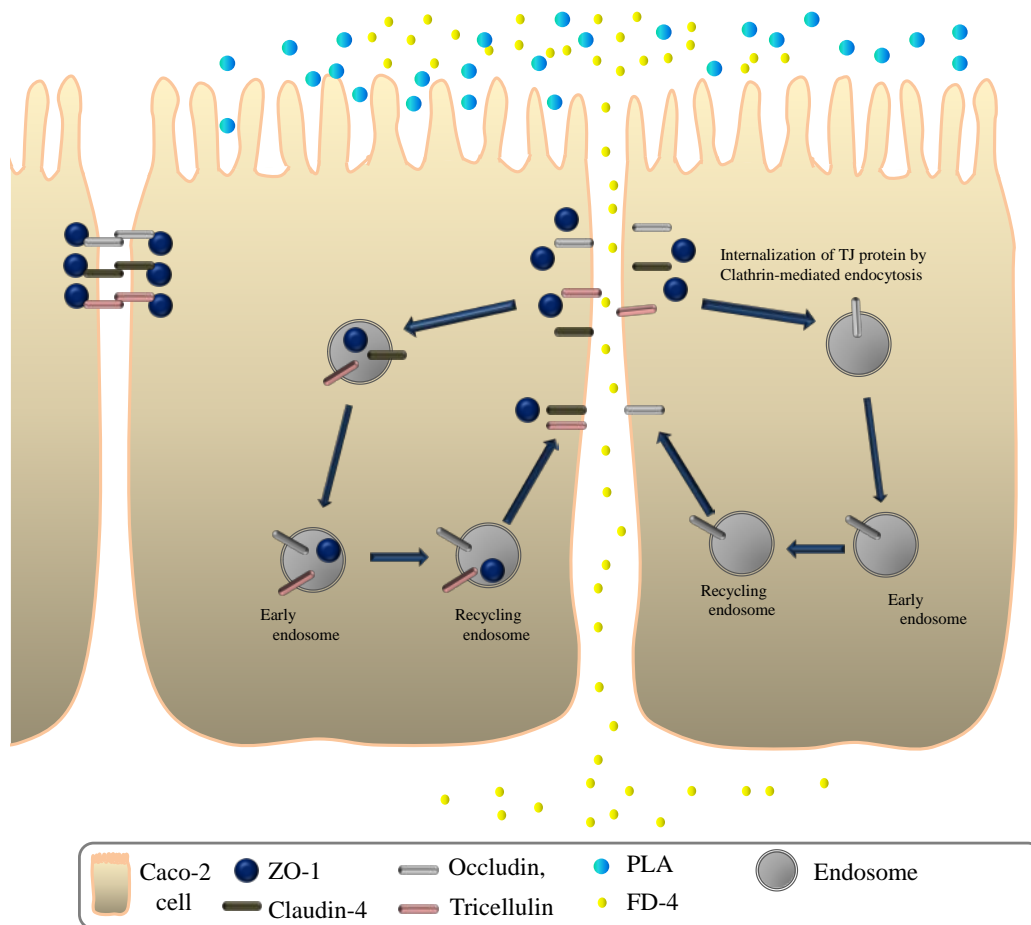


Fig. 28 Scheme of intercellular opening by PLA in Caco-2 cell.

## 2. PLA 適用によりリン酸化される細胞内タンパク質の役割

PLA の適用により細胞内において ERK1/2、p38 $\alpha$ 、JNK、MSK 及び CREB のリン酸化が認められた。ERK1/2 及び p38 $\alpha$  の阻害剤を用いた研究の結果、これらタンパク質のリン酸化は TJ の開口とは関係しないことが考えられた。

一方、PLA の適用時間に依存して ERK1/2 のリン酸化レベルは増大し、PLA 除去後 24 及び 48 時間においては ERK1/2 のリン酸化は消失しており、加えて、PLA 除去後の recovery 試験において、ERK1/2 の阻害剤を加えると、TEER の回復の遅延が認められた。

よって、Fig. 29 で示すようにリサイクリングエンドソームから細胞間隙部へ

の再局在過程で、リン酸化した ERK1/2 が TJ 関連タンパクのリン酸化を促進することにより、TJ の reassembly を促進させるのではないかと推察される。

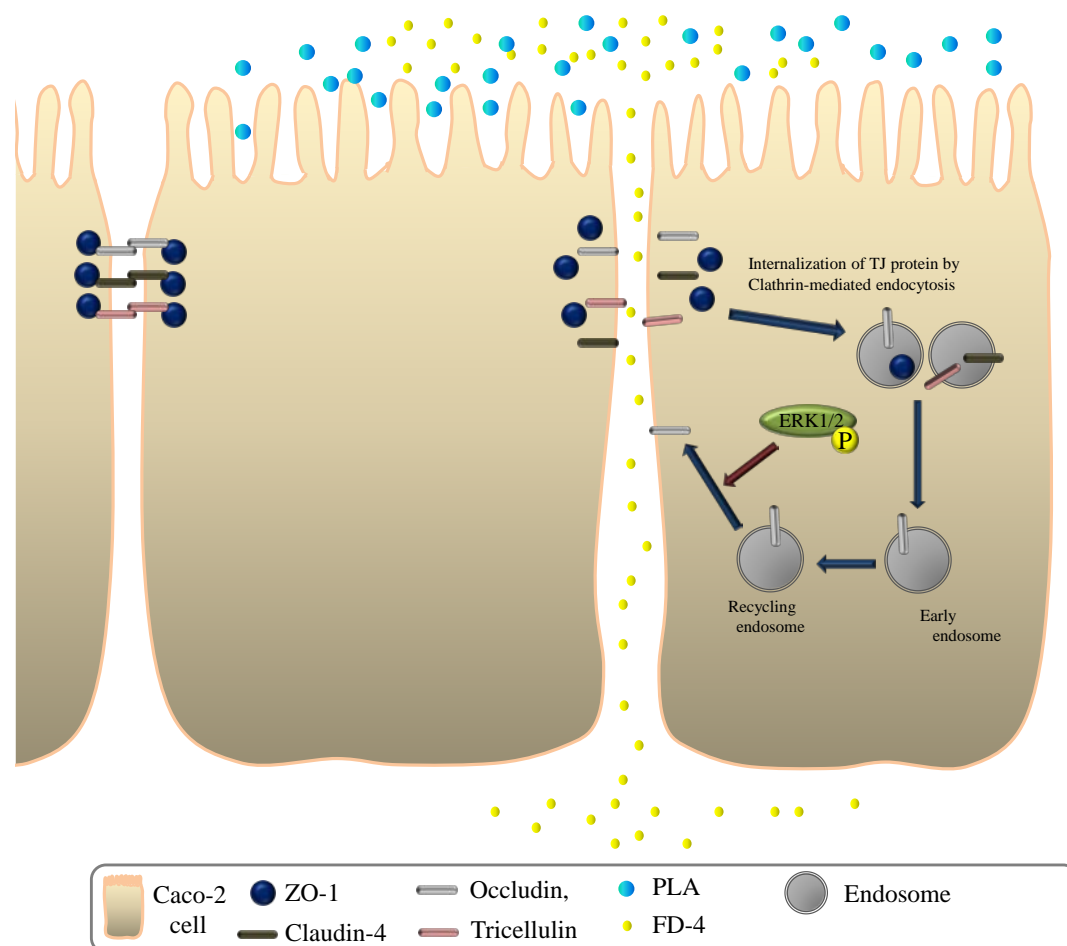


Fig. 29 Scheme of TJ reassembly by ERK1/2 in Caco-2 cell.

Figure 30 には本研究の結果並びにこれまでに報告されている PLA の吸収促進メカニズムから推察される細胞間隙経路開口メカニズムを示す。1) カチオン性ポリマーである PLA が細胞膜表面上で何らかのイオン相互作用を引き起こし、そのトリガーを介して、2) 細胞内の PKC や PTP が活性化され、ZO-1 のリン酸化及び occludin の脱リン酸化を引き起こす。同様のことが claudin や tricellulin にも起こっていると推察される。3) クラスリン介在性エンドサイトーシスが惹起

され、TJ 関連タンパク質を細胞間隙部から細胞内へと内在化し、その結果、細胞間隙経路の開口が導かれ、水溶性高分子薬物の透過を促進する。

しかしながら、PLA による TJ 開口のメカニズムの全容は未だに明らかとなっていない。特に、PLA はキトサンとは異なるリン酸化・脱リン酸化酵素が TJ の開口を引き起こすことが示唆されているため、PLA によって活性化される酵素を明らかにすることが、今後の PLA の吸収促進メカニズム解析に重要である。

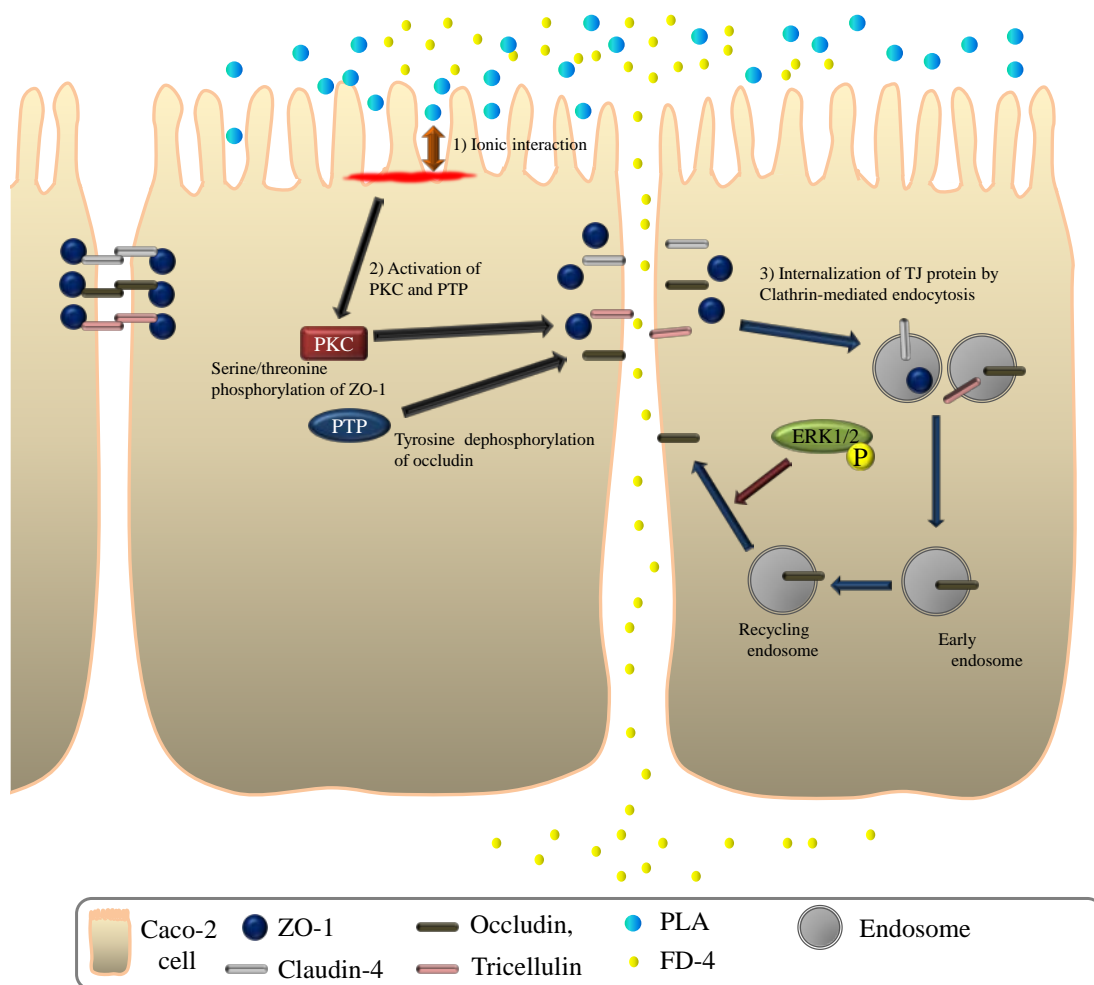


Fig. 30 Scheme of signal transduction and intercellular opening by PLA in Caco-2 cell.

## 謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました城西大学薬学部製剤学講座教授 夏目秀視先生に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始ご指導並びにご助言を賜りました城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座教授 杉林堅次先生に深謝の意を表します。

本研究に際し、終始ご指導並びにご助言を賜りました城西大学薬学部生体防御学講座教授 日比野康英先生に深謝の意を表します。

本研究に遂行にあたり、ご指導並びにご助言を賜りました城西大学薬学部製剤学講座助教 内田昌希先生に深謝の意を表します。

また、城西大学薬学部病態解析学講座助教 大竹一男先生には終始研究を見守っていただき、研究及び実験の方向性につき、温かいご指導を賜りました。心より感謝いたします。

さらに、本研究の遂行にあたりご指導並びにご助言を賜りました城西大学薬学部薬品物理化学講座教授 関 俊暢先生、城西大学薬学部製剤学講座教授 従二和彦先生、城西大学薬学部製剤学講座助手 大島新司先生、城西大学薬学部病院製剤学講座助手 木村聡一郎先生に感謝の意を表します。

最後に、研究の遂行にあたりご支援、ご協力をいただきました城西大学薬学部製剤学講座諸氏に感謝いたします。

## 引用文献

- 1) FW. Merkus, NG. Schipper, WA. Hermens, SG. Romeijin and JC. Verhoef. Absorption enhancers in nasal drug delivery: efficacy and safety. *J. Control.Rel.* **24**: 201-208 (1993)
- 2) K. Hosoya, H. Kubo, H. Natsume, K. Sugibayashi and Y. Morimoto. Evaluation of enhancers to increase nasal absorption using Ussing chamber technique. *Biol. Pharm. Bull.* **17**: 316-322 (1994)
- 3) E. Martin, JC. Verhoef, SG. Romeijin and FW. Merkus. Effects of absorption enhancers on rat nasal epithelium in vivo: release of marker compounds in the nasal cavity. *Pharm. Res.* **12**: 1151-1157 (1995)
- 4) NM. Zaki, ND. Mortada, GA. Awad, and SS. A. ElHady. Rapid-onset intranasal delivery of metoclopramide hydrochloride Part II: Safety of various absorption enhancers and pharmacokinetic evaluation. *Int. J. Pharm.* **327** (1-2): 97-103 (2006)
- 5) S. Sharma, J. Kulkarni and AP. Pawar. Permeation enhancers in the transmucosal delivery of macromolecules. *Pharmazie.* **61**: 495-504 (2006)
- 6) SG. Chandler, NW. Thomas and L. Illum. Nasal Absorption in the Rat. III. Effect of Lysophospholipids on Insulin Absorption and Nasal Histology *Pharm. Res.* **11**:1623-30 (1994)
- 7) V. Dodane, M. Amin Khan and JR. Merwin. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int. J. Pharm.* **182**: 21-32 (1999)
- 8) AF. Kotze, HL. Luessen, BJ. De Leeuw, BG. De Boer, JC. Verhoef and HE. Junginger. *Pharm. Res.* **14**: 1197-202 (1997)
- 9) Z. Donq, H. Katsumi, T. Sakane and A. Yamamoto. Effects of polyamidoamin (PAMAM) dendrimers on the nasal absorption of poorly absorbable drugs in rats. *Int.*

- J. Pharm.* **393**: 244-52 (2010)
- 10) K. Takahashi, N. Numata, N. Kinoshita, N. Utoguchi, T. Mayumi and N. Mizuno. Characterization of the influence of nitric oxide donors on intestinal absorption of macromolecules. *Int. J. Pharm.* **286**: 89-97 (2004)
  - 11) M. Kondoh, A. Masuyama, A. Takahashi, N. Asano, H. Mizuguchi, N. Koizumi, M. Fujii, T. Hayakawa, Y. Horiguchi and Y. Watanbe. A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. *Mol. Pharmacol.* **67**: 749-56 (2005)
  - 12) H. Natsume, S. Iwata, K. Ohtake, M. Miyamoto, M. Yamaguchi, K. Hosoya, D. Kobayashi, K. Sugibayashi and Y. Morimoto. Screening of cationic compounds as an absorption enhancer for nasal drug delivery. *Int. J. Pharm.* **185**: 1-12 (1999)
  - 13) M. Miyamoto, H. Natsume, I. Satoh, K. Ohtake, M. Yamaguchi, D. Kobayashi, K. Sugibayashi and Y. Morimoto. Effect of poly-L-arginine on the nasal absorption of FITC-dextran of different molecular weights and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) in rats. *Int. J. Pharm.* **11**: 127-138 (2001).
  - 14) M. Miyamoto, H. Natsume, S. Iwata, K. Ohtake, M. Yamaguchi, D. Kobayashi, K. Sugibayashi, M. Yamashina and Y. Morimoto. Improved nasal absorption of drugs using poly-L-arginine: effects of concentration and molecular weight of poly-L-arginine on the nasal absorption of fluorescein isothiocyanate-dextran in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **52**: 21-30 (2001)
  - 15) K. Ohtake, T. Maeno, H. Ueda, H. Natsume and Y. Morimoto. Poly-L- arginine predominantly increases the paracellular permeability of hydrophilic macromolecules across rabbit nasal epithelium in vitro. *Pharm. Res.* **20**:153-60 (2003)

- 16) K. Ohtake, T. Maeno, H. Ueda, M. Ogiwara, H. Natsume and Y. Morimoto. Poly-L-arginine enhances paracellular permeability via serin/threonine phosphorylation of ZO-1 and tyrosine dephosphorylation of occludin in rabbit nasal epithelium. *Pharm. Res.* **20**: 1838-45 (2003)
- 17) M. Furuse, K. Fujita, T. Hiragi, K. Fujimoto and S. Tsukita. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell. Biol.* **141**:1539-50 (1998)
- 18) M. Furuse, H. Sasaki, K. Fujimoto and S. Tsukita. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell. Biol.* **143**: 391-401 (1998)
- 19) DB. Simon, Y. Lu, KA. Choate, H. Velazquez, E. Al-Sabban, M. Praga, G. Casari, A. Bettinelli, G. Colussi, J. Rodriguez-Soriano, D. McCredie, D. Milford, S. Sanjad and RP. Lifton. Paracellin-1 a renal tight junction protein required for paracellular  $Mg^{2+}$  resorption. *Science.* **285**:103-6 (1999)
- 20) K. Mineta, Y. Yamamoto, Y. Yamazaki, H. Tanaka, Y. Tada, K. Saito, A. Tamura, M. Igarashi, T. Endo, K. Takeuchi and S. Tsukita. Predicted expansion of claudin multigene family. *FEBS Lett.* **585**: 606-12 (2011)
- 21) M. Furuse, T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita and S. Tsukita. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell. Biol.* **123**: 1777-88 (1993)
- 22) J. Ikenouchi, M. Furuse, K. Furuse, H. Sasaki, S. Tsukita and S. Tsukita. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell. Biol.* **171**: 939-45 (2005)
- 23) E. Steed, NT. Rodrigues, MS. Balda and K. Matter. Identification of MarvelD3 as a



- tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *MBC. Cell. Biol.* **10**: 95 (2009)
- 24) M. Furuse, M. Itoh, T. Hirase, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita and S. Tsukita. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J. Cell. Biol.* **127**: 1617-26 (1994)
- 25) M. Furuse, K. Fujimoto, N. Sato, T. Hirase, S. Tsukita and S. Tsukita. Overexpression of occludin, a tight junction-associated integral membrane protein, induces the formation of intracellular multilamellar bodies veering tight junction-like structures. *J. Cell. Sci.* **109**: 429-35 (1996)
- 26) A. Sakakibara, M. Furuse, M. Saitou, Y. Ando-Akatsuka and S. Tsukita. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J. Cell. Biol.* **137**: 1393-401 (1997)
- 27) M. Saitou, K. Fujimoto, Y. Doi, M. Itoh, T. Fujimoto, M. Furuse, H. Takano, S. Tsukita. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells veering tight junctions. *J. Cell. Biol.* **141**: 397-408 (1998)
- 28) M. Saitou, M. Furuse, H. Sasaki, J.D. Schulzke, M. Fromm, H. Takano, T. Noda, S. Tsukita. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell.* **11**: 4131-42 (2000)
- 29) R. Al-Sadi, K. Khatib, S. Guo, M. Youssef and T. Ma. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* **300**: G1054-64 (2011)
- 30) D. Ye, S. Guo, R. Al-Sadi and T.Y. Ma. MicroRNA regulation of intestinal epithelial tight junction permeability. *Gastroenterology.* **141**: 1323-33 (2011)
- 31) B.R. Stevenson, J.D. Siliciano, M.S. Mooseker and D.A. Goodnough. Identification of

- ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell. Biol.* **103**: 755-66 (1986)
- 32) Y. Hamazaki, M. Itoh, H. Sasaki, M. Furuse and S. Tsukita. Multi-PDZ domain protein1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* **277**: 455-61 (2002)
- 33) S. Citi, H. Sabanay, R. Jakes, B. Geiger and J. Kendrick-Jones. Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature*. **333**: 272-6
- 34) T. Lindmark, Y. Kimura and P. Artursson. Absorption enhancement through intracellular regulation of tight junction permeability by medium chain fatty acids in Caco-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**: 362-9 (1998)
- 35) A. Takahashi, M. Kondoh, A. Masuyama, M. Fujii, H. Mizuguchi, Y. Horiguchi and Y. Watanabe. Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin in its interaction with claudin-4. *J. Control. Rel.* **108**: 56-62 (2005)
- 36) LW. Hsu, PL. Lee, CT. Chen, FL. Mi, JH. Juanq, SM. Hwang, YC. Ho and HW. Sunq. Elucidating the signaling mechanism of an epithelial tight-junction opening induced by chitosan. *Biomaterials*. **33**: 6254-63 (2012)
- 37) E. Nemoto, H. Takahashi, D. Kobayashi, H. Ueda and Y. Morimoto. Effects of poly-L-arginine on the permeation of hydrophilic compounds through surface ocular tissues. *Biol. Pharm. Bull.* **29**: 155-60 (2006)
- 38) K. Hosoya, H. Kubo, H. Natsume, K. Sugibayashi, Y. Morimoto and S. Yamashita. The structural barrier of absorptive mucosae: site difference of the permeability of fluorescein isothiocyanate-labelled dextran in rabbits. *Biopharm. Drug Dispos.* **14**: 685-95 (1993)

- 39) K. Ohtake, H. Natsume, H. Ueda and Y. Morimoto. Analysis of transient and reversible effects of poly-L-arginine on the in vivo nasal absorption of FITC-dextran in rats. *J. Control. Release.* **82**: 263-75 (2002)
- 40) AM. Ugolev, LF. Smirnova, NN. Iezuitova, NM. Timofeeva, NM. Mityushova, VV. Egorova and EM. Parshkov. Distribution of some adsorbed and intrinsic enzymes between the mucosal cells of the rat small intestine and the apical glycocalyx separated from them. *FEBS Lett.* **104**: 35-8 (1979)
- 41) DM. Goldberg, R. Campbell and AD. Roy. Binding of trypsin and chymotrypsin by human intestinal mucosa. *Biochim.* **167**: 613-65 (1968)
- 42) S. Gopalakrishnan, N. Pandey, J. Vere, R. Carrasco, R. Somerville, A. Tripathi, M. Ginski, BM. Paterson and SS. Alkan. Mechanism of action of ZOT-derived peptide AT-1002, a tight junction regulator and absorption enhancer. *Int. J. Pharm.* **365**: 121-30 (2009)
- 43) MA. Behzadian, XL. Wanq, LJ. Windsor, N. Ghaly and RB. Caldwell. TGF-beta increases retinal endothelial cell permeability by increasing MMP-9: possible role of glial cells in endothelial barrier function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**: 853-9 (2001)
- 44) J. Liu, X. Jin, KJ. Liu and W. Liu. Matrix metalloproteinase-2-mediated occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage. *J. Neurosci.* **32**: 3044-57 (2012)
- 45) Al. Ivanov, A. Nusrat and CA. Parkos. Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Mol. Biol. Cell.* **15**: 176-88 (2004)

- 46) T. Murakami, EA. Felinski and DA. Antonetti. Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability. *J. Biol. Chem.* **284**: 21036-46 (2009)
- 47) SM. Stamatovic, RF. Keep, MM. Wanq, I. Jankovic and AV. Andjelkovic. Caveolae-mediated internalization of occludin and claudin-5 during CCL2-induced tight junction remodeling in brain endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **284**: 19053-66 (2009)
- 48) M. Bruewer, M. Utech, AL. Ivanov, AM. Hopkins, CA. Parkos and A. Nusrat. Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *FASEB.* **19**: 923-33 (2005)
- 49) M. Utech, R. Mennigen and M. Bruewer. Endocytosis and recycling of tight junction proteins in inflammation. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**: 484987 (2010)
- 50) S. Tsukita and M. Furuse. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Cell Biol.* **7**: 268-73 (1999)
- 51) BM. Denker and SK. Nigam. Molecular structure and assembly of tight junction. *Am. J. Physiol.* **274**: F1-F-9 (1998)
- 52) NS. Harhaj and DA. Antonetti. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**: 1206-1237 (2004)
- 53) S. Tsukita, M. Furuse, and M. Itoh. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**(4): 285-93 (2001)
- 54) JM. Smith, M. Dornish and EJ. Wood. Involvement of protein kinase C in chitosan glutamate-mediated tight junction disruption. *Biomaterials.* **26**: 3269-76 (2005)
- 55) L. Gonzalez-Mariscal, B. Chaves de Ramirez and M. Cereijido. Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *J. Membr. Biol.* **86**: 113-125 (1985)

- 56) MS. Balda, L. Gonzalez-Mariscal, K. Matter, M. Cereijido and JM. Anderson.  
Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol. *J. Cell Biol.* **123**: 293-302  
(1993)
- 57) RO. Stuart and SK. Nigam. Regulated Assembly of Tight Junctions by Protein  
Kinase C. *Proc. Natr, Acad. Sci. USA* **92**: 6072-76 (1995)
- 58) C. Saha, SK. Nigam and BM. Denker. Involvement of Galphai2 in the maintenance  
and biogenesis of epithelial cell tight junctions. *J. Cell Biol.* **273**: 21629-33 (1998)
- 59) KL. Singer, BR. Stevenson, PL. Woo and GL. Firestone. Relationship of  
serine/threonine phosphorylation/dephosphorylation signaling to glucocorticoid  
regulation of tight junction permeability and ZO-1 distribution in nontransformed  
mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 16108-115 (1994)
- 60) A. Sakakibara, M. Furuse, M. Saitou, Y. Ando-Akatsuka and S. Tsukita. Possible  
involvement of phosphorylation of occluding in tight junction formation. *J. Cell  
Biol.* **137**: 1393-1401 (1997)
- 61) T. Tsukamoto and S. Nigam. Role of tyrosine phosphorylation in the reassembly of  
occludin and other tight junction proteins. *Am. J. Physiol.* **276**: F737-F750 (1999)
- 62) A. Banan, LJ. Zhang, M. Shaikh, JZ. Fields, S. Choudhary, CB. Forsyth, A. Farhadi  
and A. Keshavarzian. Theta isoform of protein kinase C alter barrier function in  
intestinal epithelium through modulation of distinct claudin isotypes: a novel  
mechanism for regulation of permeability. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **313**: 962-82  
(2005)
- 63) MJ. Dorfel, JK. Westphal and O. Huber. Differential phosphorylation of occludin  
and tricellulin by CK2 and CK1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1165**: 69-73 (2009)
- 64) ST. Ballard, JH. Hunter and AE. Taylor. Regulation of tight-junction permeability

- during nutrient absorption across the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Nutr.* **15**: 35-55 (1995)
- 65) M. Cereijido, J. Valdes, L. Shoshani and R.G. Contreras. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu. Rev. Physiol.* **60**: 161-177 (1998)
- 66) Y. Chen, G. Lu, EE. Schneeberger and DA. Goodenough. Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell.* **11**: 849-862 (2000)
- 67) CG. Kevil, T. Oshima, B. Alexander, LL. Coe and JS. Alexander. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated permeability: role of MAPK and occluding. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**: C21–C30 (2000)
- 68) PL. Woo, D. Ching, Y. Guan and GL. Firestone. Requirement for Ras and phosphatidylinositol 3-kinase signaling uncouples the glucocorticoid-induced junctional organization and transepithelial electrical resistance in mammary tumor cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 32818-32828 (1999)
- 69) SV. Walsh, AM. Hopkins, J. Chen, S. Narumiya, CA. Parkos and A. Nusrat. Rho kinase regulates tight junction function and is necessary for tight junction assembly in polarized intestinal epithelia. *Gastroenterology.* **121**: 566-579 (2001)
- 70) V. Nunbhakdi-Craig, T. Machleidt, E. Ogris, D. Bellotto, C. L. White and E. Sontag. Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *J. Cell Biol.* **158**: 967-978 (2002)
- 71) KJ. Atkinson and RK. Rao. Role of protein tyrosine phosphorylation in acetaldehyde-induced disruption of epithelial tight junctions. *Am. J. Physiol.* **280**: G1280-G1288 (2001)

- 72) E. Miyauchi, J. O'Callaghan, L.F. Butto, G. Hurley, S. Melgar, S. Tanabe, F. Shanahan, K. Nally and P.W. O'Toole. Mechanism of protection of transepithelial barrier function by *Lactobacillus salivarius*: strain dependence and attenuation by bacteriocin production. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* **303**: G1029-41 (2012)
- 73) Y.H. Chen, Q. Lu, D.A. Goodenough and B. Jeanson. Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. *Mol. Biol. Cell.* **13**: 1227-37 (2002)
- 74) G. Samak, D. Narayanan, J.H. Jaggard and R. Rao. CaV1.3 channels and intracellular calcium mediate osmotic stress-induced N-terminal c-Jun kinase activation and disruption of tight junctions in Caco-2 cell monolayers. *J. Biol. Chem.* **286**: 30232-43 (2011)